



Natália Baratella Panzoldo

**“CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E FUNCIONAIS DA  
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) NA  
HIPOALFALIPOPROTEINEMIA E NA ATEROCLEROSE  
SUBCLÍNICA”**

***“PHENOTYPICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF  
HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN (HDL) ON  
HYPOALPHALIPOPROTEINEMIA OR SUBCLINICAL  
ATHEROSCLEROSIS”***

**CAMPINAS  
2014**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Natália Baratella Panzoldo

**“CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E FUNCIONAIS DA  
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) NA  
HIPOALFALIPOPROTEINEMIA E NA ATEROCLEROSE SUBCLÍNICA”**

**Orientador:** Prof. Dr. Andrei Carvalho Sposito

**Co-Orientadora:** Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria

***“PHENOTYPICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF HIGH-  
DENSITY LIPOPROTEIN (HDL) ON HYPOALPHALIPOPROTEINEMIA OR  
SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS”***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutora em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

*Doctorate thesis presented to the Medical Sciences Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D grade in Biomedical Sciences.*

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA NATÁLIA BARATELLA  
PANZOLDO E ORIENTADA PELO PROF.DR.ANDREI  
CARVALHO SPOSITO.**

Assinatura do orientador

---

CAMPINAS  
2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P196c Panzoldo, Natália Baratella, 1987-  
Características fenotípicas e funcionais da lipoproteína de alta densidade (HDL) na hipoalfalipoproteinemia e na aterosclerose subclínica / Natália Baratella Panzoldo. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Andrei Carvalho Sposito.  
Coorientador: Eliana Cotta de Faria.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Lipoproteínas HDL. 2. Hipoalfalipoproteinemias. 3. Aterosclerose. I. Sposito, Andrei Carvalho. II. Faria, Eliana Cotta de, 1950-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Phenotypical and functional characteristics of high-density lipoprotein (HDL) on hypoalphalipoproteinemia or subclinical atherosclerosis

**Palavras-chave em inglês:**

Lipoproteins HDL

Hypoalphalipoproteinemia

Atherosclerosis

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Doutora em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Andrei Carvalho Sposito [Orientador]

José Rocha Faria Neto

Patricia Miralda Cazita

Wilson Nadruz Junior

Helena Coutinho Franco de Oliveira

**Data de defesa:** 14-05-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

---

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

NATÁLIA BARATELLA PANZOLDO

---

---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANDREI CARVALHO SPOSITO

Co-Orientador (a) PROF(A). DR(A). ELIANA COTTA DE FARIA

---

---

### MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). ANDREI CARVALHO SPOSITO

2. PROF(A). DR(A). JOSÉ ROCHA FARIA NETO

3. PROF(A). DR(A). PATRICIA MIRALDA CAZITA

4. PROF(A). DR(A). WILSON NADRUZ JUNIOR

5. PROF(A). DR(A). HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA

---

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 14 de maio de 2014

---



*Aos meus pais Joice e Vitor,  
e ao meu marido Leví*





Ao Prof Dr Andrei Carvalho Sposito, por todos os ensinamentos e pela excelente orientação. Agradeço pela atenção, disponibilidade, pelo estímulo constante, e por ser um exemplo de ética, competência e dedicação à pesquisa.

À Profa Dra Eliana Cotta de Faria, por toda a dedicação e ensinamentos. Agradeço por ter aberto as portas do Laboratório de Lípidos para mim, e por ter permitido que eu conhecesse e me encantasse pela Bioquímica. Os últimos cinco anos foram repletos de novos aprendizados e oportunidades, que seriam impossíveis sem o seu voto de confiança.

Às amigas e companheiras de doutorado Eliane Soler Parra e Vanessa Zago. A pós graduação foi um período de muitos ganhos, e vocês certamente estão entre os principais. Agradeço por todos os dias passados com vocês, por todas as aflições e dificuldades compartilhadas, por todos bons conselhos, pelo apoio e confiança constantes. Obrigada pela excelente companhia em Congressos e viagens inesquecíveis, e por serem minhas madrinhas tão queridas.

Aos amigos do Laboratório de Lípidos: Carminha, Cidinha, Carol Beraldo, Carol Fonseca, Daniel, Érica, Felipe, Fernanda, Isabela, Taís, Vitor, e todos os que passaram pelo

Laboratório. Obrigada por tornarem os meus dias mais divertidos, pela companhia, apoio e paciência. A pós graduação não seria completa sem vocês.

Aos amigos do AteroLab, especialmente à Valéria Figueiredo, pela acolhida, companhia, pelas risadas, por estar sempre disposta a me ajudar, e pelas excelentes contribuições no meu trabalho.

Aos funcionários da Seção de Bioquímica Clínica do HC, especialmente à Mirian, Hildinha, Simone e Claudimeire, por toda ajuda e disponibilidade.

Ao Laboratório de Lípidos (LIM-10) da USP, especialmente Dra Patrícia Cazita, Dra Camila Leança, Dra Valéria Nunes, Profa. Dra Edna Nakandakare e Prof Dr Eder Quintão. pela colaboração nas diversas etapas deste estudo, e por sempre me receberem tão bem no laboratório.

Ao Prof Dr Matti Jauhiainen e ao Dr Jari Metso, do Instituto Nacional de Saúde e Bem-estar (NIHW), de Helsinki/Finlândia, pela excelente recepção no Laboratório, pelo auxílio em parte das análises do estudo, e por estarem sempre disponíveis para as (frequentes) dúvidas.

Ao Laboratório de Biologia Vascular, do INCOR, pela doação das linhagens celulares e por todo auxílio durante a implantação da cultura de células no laboratório.

Ao Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da Unicamp, especialmente ao Prof Dr Erich de Paula, à Tania Machado e à Profa Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacch, pelo auxílio imprescindível no desenvolvimento do método de atividade antitrombótica da HDL, e por abrirem as portas do Laboratório toda semana.

A todos os voluntários que participaram deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado direto, e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Aos amigos tão queridos, Carolina, Isabella, Viviane, Felipe, Caroline, Camila, Danila, Débora, Lara, Inajara, Raquel e Marcelo, por todos os anos de amizade, pela constante presença apesar da distância e por todo incentivo, sempre.

À minha família, especialmente minha avó Guiomar, tios e primos queridos, meus sogros e cunhados, pelo amor e apoio incondicionais. A melhor parte de toda conquista é poder comemorar com vocês!

Aos meus pais, Joice e Vitor, por me incentivarem, desde criança, a estudar e a gostar de aprender. Agradeço pelo apoio, confiança, por sempre torcerem por mim, vibrarem comigo a cada conquista, e me ajudarem nos momentos de dificuldade. Obrigada por serem os

melhores pais do mundo e meus exemplos de vida. Não existem palavras suficientes para expressar minha gratidão.

Ao meu marido Leví, certamente o maior entusiasta, por nunca duvidar da minha capacidade e das minhas escolhas, e pela certeza nos momentos incertos. Agradeço por sempre se empolgar junto comigo com os achados do meu estudo e com cada conquista. Obrigada pela paciência, cumplicidade e bom humor, sempre presentes nos nossos sete anos juntos.

E, acima de tudo, agradeço a Deus, sem o qual nada seria possível.

Muito obrigada!

.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
volta ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein



Doenças cardiovasculares constituem a principal causa de mortalidade no Brasil e no mundo. Baixas concentrações de HDL-colesterol são consideradas um fator de risco cardiovascular independente. Esta relação inversa tem sido atribuída às diferentes propriedades protetoras da HDL, dentre as quais podemos destacar seu papel no transporte reverso de colesterol, por meio do efluxo de colesterol, sua habilidade de inibir a agregação plaquetária, e suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. No entanto, estudos recentes indicam que baixas concentrações de HDL-colesterol constituem um preditor significativo de doença aterosclerótica somente em indivíduos assintomáticos e que a capacidade de efluxo de colesterol é um melhor preditor de carga aterosclerótica do que HDL-colesterol. Em conjunto, estes achados sugerem que a função da HDL poderia ser um fator chave na relação entre concentrações de HDL-colesterol e o desenvolvimento de doença aterosclerótica. Se o for, alterações das funções da HDL podem discernir melhor, entre os indivíduos com hipoalfalipoproteinemia, aqueles com maior propensão a desenvolver doença aterosclerótica. Assim, investigamos, em indivíduos sem doença cardiovascular previamente manifesta, se funções da HDL estão associadas a concentrações de HDL-colesterol e carga aterosclerótica. Participantes foram classificados em HDL-colesterol baixo (LH; HDL-C  $\leq$  32 mg/dL; n=33), intermediário (IH; HDL-C = 40-67 mg/dL; n=33), ou alto (HH; HDL-C  $\geq$  78mg/dL; n=35). Nós avaliamos composição química

da HDL, tamanho da partícula, capacidade de efluxo de colesterol, atividade antioxidante, susceptibilidade à oxidação, atividade anti-inflamatória, e habilidade de inibir agregação plaquetária. O grupo LH foi associado à espessura intimo-medial de carótidas (IMT) aumentada ( $p \leq 0,001$ ), maior conteúdo de triglicérides ( $4 \pm 2\%$  vs.  $4 \pm 2\%$  em IH e  $3 \pm 1\%$  em HH,  $p \leq 0,001$ ), menor conteúdo de fosfolípidos ( $12 \pm 4\%$  vs.  $14 \pm 5\%$  em IH e  $13 \pm 3\%$  em HH,  $p = 0,035$ ), menor tamanho de partículas ( $7,33 \pm 0,33 \text{ nm}$  vs.  $7,72 \pm 0,45 \text{ nm}$  em IH e  $8,49 \pm 0,42 \text{ nm}$  em HH,  $p \leq 0,001$ ) e menor capacidade de efluxo de colesterol celular ( $9 \pm 3\%$  vs.  $12 \pm 3\%$  em IH e  $11 \pm 4\%$  em HH,  $p \leq 0,001$ ). Indivíduos HH apresentaram menor atividade antioxidante ( $37(53)\%$  vs.  $48(35)\%$  em IH e  $55(41)\%$  em LH,  $p = 0,003$ ), maior susceptibilidade à oxidação ( $57 \pm 22\%$  vs.  $45 \pm 20\%$  em IH e  $46 \pm 25\%$  em LH,  $p = 0,017$ ) e maior habilidade de inibir agregação plaquetária ( $45 \pm 25\%$  vs.  $31 \pm 18\%$  em IH e  $37 \pm 24\%$  em LH,  $p = 0,0026$ ). Indivíduos com IMT acima de 1 mm apresentaram partículas com menor tamanho ( $7,55 \pm 0,49 \text{ nm}$  vs.  $7,89 \pm 0,64 \text{ nm}$ ,  $p \leq 0,001$ ), atividade antioxidante ( $37(23)\%$  vs.  $49(42)\%$ ,  $p = 0,018$ ) e capacidade de efluxo de colesterol ( $31 \pm 14\%$  vs.  $40 \pm 14\%$ ,  $p = 0,02$ ). Nenhuma diferença foi encontrada para as outras características ou propriedades funcionais da HDL. Nós concluímos que, em um contexto de prevenção primária, o menor tamanho da partícula, o conteúdo reduzido de fosfolípidos, e capacidade de efluxo de colesterol diminuída são relacionados com ambos LH e magnitude da doença aterosclerótica subclínica. Nestes indivíduos, estas características podem explicar a associação entre HDL-colesterol e o desenvolvimento da doença aterosclerótica.



Cardiovascular diseases are the main cause of death in Brazil and worldwide. Low HDL-C levels are considered an independent cardiovascular risk factor. This inverse relationship has been attributed to different protective properties described for HDL, such as its role in the reverse cholesterol transport, through cholesterol efflux, its ability to inhibit platelet aggregation, and its antioxidant and anti-inflammatory effects. However, recent studies indicate that low HDL-cholesterol is a significant predictor of atherosclerotic disease in healthy individuals and that cholesterol efflux capacity is a better predictor of carotid atherosclerotic burden as compared to HDL-cholesterol. Altogether these findings have suggested that HDL function would be the key factor for the link between HDL-cholesterol concentration and the subclinical disease in a primary prevention setting. If so, changes in HDL function could help to discriminate, among individuals with hypoalphalipoproteinemia, those who are prone to develop atherosclerotic disease. Hence, in a primary prevention setting, we investigated whether HDL dysfunction is associated with HDL-cholesterol concentration and atherosclerotic burden. Participants were classified as low (LH; HDL-C $\leq$  32 mg/dL; n=33), intermediate (IH; HDL-C= 40-67 mg/dL; n=33), or high HDL-cholesterol (HH; HDL-C $\geq$ 78mg/dL; n=35). We measured HDL chemical composition, particle size, cholesterol efflux capacity, antioxidant activity, susceptibility to oxidation, anti-inflammatory activity, and ability to inhibit platelet aggregation. LH was associated to enhanced carotid intima-media thickness (IMT;p $\leq$ 0.001), high HDL-

triglyceride ( $4\pm 2\%$  vs.  $4\pm 2\%$  in IH and  $3\pm 1\%$  in HH,  $p\leq 0.001$ ), low HDL-phospholipids ( $12\pm 4\%$  vs.  $14\pm 5\%$  in IH and  $13\pm 3\%$  in HH,  $p=0.035$ ), decreased particle size ( $7.33\pm 0.33\text{nm}$  vs.  $7.72\pm 0.45\text{nm}$  in IH and  $8.49\pm 0.42\text{nm}$  in HH,  $p\leq 0.001$ ) and reduced cholesterol efflux capacity ( $9\pm 3\%$  vs.  $12\pm 3\%$  in IH and  $11\pm 4\%$  in HH,  $p\leq 0.001$ ). The HH group presented reduced antioxidant activity ( $37(53)\%$  vs.  $48(35)\%$  in IH and  $55(41)\%$  in LH,  $p=0.003$ ), and increased susceptibility to oxidation ( $57\pm 22\%$  vs.  $45\pm 20\%$  in IH and  $46\pm 25\%$  in LH,  $p=0.017$ ) and ability to inhibit platelet aggregation ( $45\pm 25\%$  vs.  $31\pm 18\%$  in IH and  $37\pm 24\%$  in LH,  $p=0.0026$ ). Carotid IMT  $>1\text{mm}$  was associated with reduced HDL size ( $7.55\pm 0.49\text{ nm}$  vs.  $7.89\pm 0.64\text{ nm}$ ,  $p\leq 0.001$ ), antioxidant activity ( $37(23)\%$  vs.  $49(42)\%$ ,  $p=0.018$ ), and cholesterol efflux capacity ( $31\pm 14\%$  vs.  $40\pm 14\%$ ,  $p=0.02$ ). No differences were found for the other HDL characteristics or functional properties. We conclude that in a primary prevention setting, small particle size, reduced HDL-phospholipids content, and diminished cholesterol efflux capacity are related to both LH and carotid IMT. In these individuals, these characteristics may underlie the association between HDL-cholesterol and atherosclerotic burden.

ABCA-1, *ATP binding cassette transporter A1*

ABCG-1, *ATP binding cassette transporter G1*

ABCG-5, *ATP binding cassette transporter G5*

ABCG-8, *ATP binding cassette transporter G8*

AMPK, proteína quinase ativada por AMP

Apo, apolipoproteína

CETP, proteína de transferência de colesterol esterificado

DCV, doenças cardiovasculares

DHCR24, 3-betahidroxiesteróide-delta 24-redutase

eNOS, óxido nítrico sintase endotelial

HDL, lipoproteína de alta densidade

HDL-C, HDL-colesterol

HDLr, HDL recombinante

ICAM-1, molécula de adesão intercelular-1

IKK, I $\kappa$ B quinase

IMC, índice de massa corpórea

LCAT, lecitina:colesterol aciltransferase

LDL, lipoproteína de baixa densidade

LDL-C, LDL-colesterol

LDLox, LDL oxidada

LE, lipase endotelial

LH, lipase hepática

LOX-1, *lectin-like oxidized LDL receptor 1*

LPL, lipoproteína lipase

LXR, *liver x receptor*

MCP-1, proteína quimiotática de monócitos-1

NFκB, fator nuclear κB

NO, óxido nítrico

PAF-AH, fator de ativação plaquetária acetil hidrolase

PLTP, proteína de transferência de fosfolípidos

PON1, paraoxonase1

ROS, espécies reativas de oxigênio

RXR, *retinoid x receptor*

SR-BI, *scavenger receptor class B type I*

TNF, fator de necrose tumoral

VCAM-1, molécula de adesão celular vascular-1

**Quadro 1:** Estudos em animais associando aumento de HDL-C e inibição de aterosclerose

..... 34



<b>Figura 1.</b> Progressão e desenvolvimento da placa aterosclerótica .....	30
<b>Figura 2.</b> Estrutura da partícula esférica de HDL.....	36
<b>Figura 3.</b> Heterogeneidade das partículas de HDL.....	40
<b>Figura 4.</b> Principais vias do metabolismo da HDL .....	43
<b>Figura 5.</b> Principais vias envolvidas no efluxo de colesterol mediado pela HDL.....	46
<b>Figura 6.</b> Ação antioxidante da HDL na LDL.....	52
<b>Figura 7.</b> Ação anti-inflamatória da HDL.....	57
<b>Figura 8.</b> Ação antitrombótica da HDL.....	62





---

Introdução geral .....	27
1. Doenças cardiovasculares e aterosclerose .....	29
1.1. Doenças cardiovasculares e HDL .....	32
2. Lipoproteína de alta densidade .....	35
2.1. Estrutura, composição e heterogeneidade .....	35
2.2. Metabolismo .....	41
2.3. Atividades Biológicas .....	44
2.3.1. Capacidade de Efluxo de Colesterol .....	44
2.3.2. Atividade Antioxidante .....	50
2.3.3. Atividade Anti-inflamatória .....	55
2.3.4. Atividade Antitrombótica .....	60
3. Justificativa .....	63
Objetivos .....	65
Capítulo .....	69
Conclusão geral .....	101
Referências bibliográficas .....	105
Anexo .....	119
Aprovação do Comitê de Ética .....	121



*Introdução Geral*



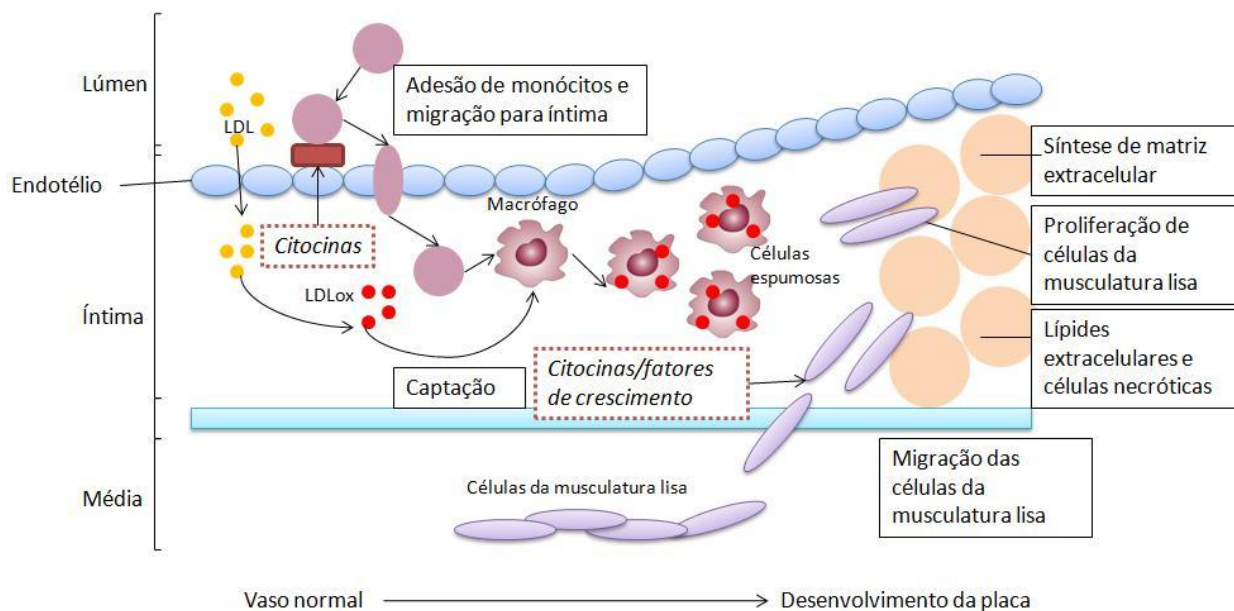
## 1. Doenças cardiovasculares e aterosclerose

As doenças cardiovasculares (DCV) são a causa mais comum de morte nas sociedades ocidentais, afetando tanto homens como mulheres (1, 2). No Brasil, a taxa de mortalidade por DCV diminuiu cerca de 35% entre 1990 e 2009; na região metropolitana de São Paulo, essa redução foi mais acentuada, cerca de 42%. No entanto, apesar desta redução progressiva no país, as taxas de mortalidade permanecem altas (3). Além disso, de acordo com Baena et al. (4), apesar de haver uma tendência para redução na taxa de mortalidade por doença isquêmica do coração nas regiões Sul e Sudeste, até 2015, essa taxa ainda pode crescer nas regiões Norte e Nordeste do país. Segundo a Organização Mundial da Saúde<sup>1</sup> (1), estima-se que o número de mortes por DCV no mundo, principalmente doenças cardíacas e cerebrovasculares, vão aumentar e alcançar 23,3 milhões até 2030.

A aterosclerose representa um processo patogênico que corresponde a uma parcela significativa da morbidade e mortalidade cardiovascular (5). O papel chave do colesterol plasmático no início da aterosclerose foi sugerido em 1913 por Nikolai Anitschkow *apud* Konstantinov et al. (6). Cerca de 40 anos depois, esse conceito foi refinado por Howard Eder e colaboradores (7), que demonstraram uma prevalência de  $\beta$ -lipoproteínas, ou lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ricas em colesterol, e uma escassez de  $\alpha$ -lipoproteínas, lipoproteínas de alta densidade (HDL), na aterosclerose e em condições relacionadas.

---

<sup>1</sup><http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>



**Figura 1. Progressão e desenvolvimento da placa aterosclerótica.** A disfunção endotelial aumenta a permeabilidade à LDL, que, no espaço subendotelial, pode ficar retida e passar por modificações oxidativas, formando LDL oxidada (LDLox). Ela também está associada ao aumento da expressão de moléculas de adesão, que causam o rolamento dos monócitos e migração para o espaço subendotelial. Os monócitos se diferenciam em macrófagos, que tem a habilidade de se ligar e internalizar LDLox, originando as células espumosas. Alguns mediadores da inflamação promovem a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima, que se proliferam e sintetizam componentes da matriz extracelular, como colágeno e proteoglicanas. A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes de matriz extracelular e núcleo lipídico e necrótico, formado principalmente por debris celulares. Adaptado de Kumar et al. (8).

Atualmente, a aterosclerose é reconhecida como uma doença inflamatória crônica, de origem multifatorial (Figura 1). A dislipidemia, assim como outros fatores de

risco, como hipertensão arterial e tabagismo, danifica o endotélio vascular (9), interferindo no balanço entre vasoconstrição e vasodilatação, e dando início a diferentes processos envolvidos na aterosclerose, como o aumento da permeabilidade endotelial (10). Este aumento da permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas favorece a retenção das mesmas no espaço subendotelial (10), que ocorre por meio de interações iônicas entre os domínios positivos da apolipoproteína (apo) B, principal componente proteico da LDL, com proteínas negativas na matriz extracelular, incluindo proteoglicanas, colágeno, e fibronectina (11). Uma vez no espaço subendotelial, a LDL pode ser oxidada por radicais livres, processo que resulta na formação de partículas de LDL oxidadas (LDLox) (12).

Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, a disfunção endotelial está associada ao aumento da expressão de moléculas de adesão leucocitária, incluindo a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), e E-selectina, em um processo estimulado pela presença de LDLox. Estas moléculas de adesão causam o rolamento de células sanguíneas, como monócitos, pela superfície vascular. Uma vez ligadas, quimiocinas produzidas na íntima, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), estimulam a migração das células sanguíneas pelas junções endoteliais, para o espaço intimal (13). Neste espaço, os monócitos se diferenciam em macrófagos, que expressam receptores “*scavenger*”, alguns dos quais tem a habilidade de se ligar e internalizar LDLox. Por meio desse processo, os macrófagos se convertem em células espumosas, que, com sua apoptose, dão origem às estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (14).

Os macrófagos ativados contribuem para a progressão da placa aterosclerótica, pois secretam citocinas que amplificam a inflamação, e enzimas proteolíticas que degradam colágeno e outros componentes teciduais locais (9). Alguns mediadores da inflamação promovem a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima, que se proliferam e sintetizam componentes da matriz extracelular, como colágeno e proteoglicanas, formando a capa fibrosa da placa aterosclerótica (15).

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes de matriz extracelular e núcleo lipídico e necrótico, formado principalmente por debris celulares. Diferentes composições de placas, caracterizadas por diferentes razões entre capa fibrosa e núcleo lipídico, parecem estar associadas a diferentes desfechos clínicos (16). Placas consideradas estáveis são fibrosas, frequentemente com inclusões calcificadas e com ausência ou apenas pequenas quantidades de lípidos extracelulares. Por outro lado, placas tipicamente vulneráveis são caracterizadas por grande conteúdo de lípidos e possuem uma capa fibrosa fina (16). Placas vulneráveis são mais propensas a rupturas, que podem levar à trombose, e à embolização de fragmentos lipídicos, levando à oclusão de vasos. Acredita-se que a ruptura da placa é responsável pela maioria das síndromes coronarianas agudas, que são, por sua vez, as principais causas de morbidade e mortalidade cardiovascular (15).

### 1.1. Doenças Cardiovasculares e HDL



Diferentes estudos populacionais mostraram que as concentrações plasmáticas tanto de HDL-colesterol (HDL-C) quanto da apoA-I são preditores independentes, inversos, de risco de evento cardiovascular (17-21). Além disso, baixas concentrações de HDL-C foram preditoras de eventos cardiovasculares graves em pacientes tratados com estatinas, relação observada também em pacientes com concentrações de LDL-colesterol (LDL-C) inferiores a 70 mg/dL (22).

Estudos em animais demonstraram que intervenções que aumentam as concentrações de HDL-C inibem o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose (Quadro 1). Em humanos, a administração intravenosa de cinco doses de complexos de fosfolípidos e apoA-I Milano, em intervalos semanais, em pacientes com síndromes coronarianas agudas, resultou em regressão significativa da aterosclerose coronariana, medida por ultrassonografia intravascular (23). Em outro estudo, infusões de HDL recombinante (HDLr) reduziram a progressão do volume da placa aterosclerótica, mas pelo pequeno tamanho amostral, a diferença só se mostrou significativa quando comparada à medida basal e não ao grupo placebo (24).

Com relação à identificação do risco cardiovascular, o papel aditivo dos níveis de HDL-C parecem igualmente incertos. Por exemplo, a inclusão de HDL-C ao SCORE (*Systematic COronary Risk Evaluation*), um sistema de estimativa de risco recomendado pelas diretrizes Europeias, resultou em uma melhora de apenas 2,2% na reclassificação correta do risco cardiovascular na população geral (25). Além disso, e de forma importante, estudos recentes mostraram que o valor preditivo do HDL-C para mortalidade cardiovascular é enfraquecido na presença de doença arterial coronariana estabelecida (26).

**Quadro 1.** Estudos em animais associando aumento de HDL-C e inibição de aterosclerose

<b>Modelo e tratamento</b>	<b>Achados</b>	<b>Referência</b>
Coelhos; dieta pró-aterogênica seguida por infusão de HDLr	Regressão de estrias gordurosas aórticas estabelecidas	Badimon et al., 1990 (27)
Camundongos apoE <i>knockout</i> ; transgene da apoA-I humana	Redução de seis vezes na suscetibilidade à aterosclerose	Paszy et al., 1994 (28)
Coelhos apoA-I transgênicos; dieta rica em colesterol	Aumento no TRC e proteção contra aterosclerose	Duverger et al., 1996 (29)
Coelhos; infusão de HDL	Rápida redução no tamanho da lesão	Nicholls et al., 2005 (30)

HDLr, HDL recombinante; TRC, transporte reverso de colesterol.

Estudos clínicos com o objetivo de avaliar os efeitos do aumento de HDL-C por meio de terapias com niacina e inibidores de proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) não demonstraram nenhum benefício cardiovascular clínico (31-34). Ainda, o uso do RVX-208, um medicamento que induz a síntese de apoA-I, em pacientes com doença arterial coronariana não resultou em alterações em ateroma coronariano avaliado por ultrassonografia intravascular (35).

Do mesmo modo, um estudo recente de aleatorização Mendeliana mostrou que alguns mecanismos genéticos que aumentam as concentrações de HDL-C parecem não reduzir o risco de infarto do miocárdio, o que desafia o conceito de que aumentar HDL-C se traduz em benefício clínico (36).

Esse aparente paradoxo pode, hipoteticamente, ser atribuído à qualidade da HDL que está presente nos indivíduos cujos níveis são usados para predição de risco

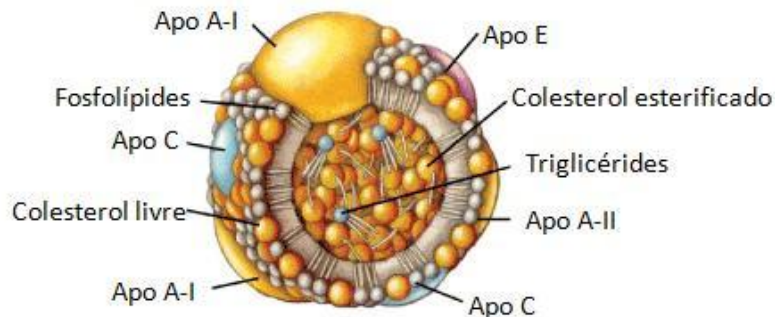
cardiovascular ou são aumentados por terapias medicamentosas. O declínio da função da HDL pode não permitir que seu aumento tenha qualquer impacto no risco cardiovascular. Se o for, medidas da função da HDL podem facilitar a estimativa do risco cardiovascular e igualmente da escolha da melhor terapia medicamentosa. Consistente com essa hipótese, a administração de HDLr, com composição e função distintas do HDL circulante, reduz a progressão da doença aterosclerótica.

## 2. Lipoproteína de alta densidade (HDL)

### 2.1. Estrutura, composição e heterogeneidade

As lipoproteínas podem ser definidas como complexos plurimoleculares, tipicamente esféricos, pseudomicelares, compostos de lípides polares e apolares solubilizados por apolipoproteínas, proteínas com estruturas e funções especializadas (37). As partículas de HDL (Figura 2) representam as lipoproteínas de menor tamanho, maior densidade e maior conteúdo de proteínas, e constituem um grupo heterogêneo de pequenas partículas discoides e esféricas, com diâmetro entre 7 e 12 nm (38).

As proteínas da HDL compreendem apolipoproteínas estruturais, enzimas, proteínas de transferência de lípidos e outras proteínas menores (39). Estudos recentes de proteômica identificaram até cinquenta proteínas diferentes associadas à HDL isolada por ultracentrifugação (40, 41).



**Figura 2. Estrutura da partícula esférica de HDL**, indicando seus principais componentes proteicos e lipídicos. Adaptado de Forti & Diamant (42).

A apoA-I, uma proteína de massa molecular de 28 kDa, é a principal apolipoproteína estrutural e funcional da HDL, e corresponde a cerca de 70% de todo conteúdo proteico da partícula (43). Ela representa uma proteína anfipática típica, com oito domínios anfipáticos alfa-hélice de 22 aminoácidos e duas repetições de 11 aminoácidos. Como consequência, esta apolipoproteína se liga avidamente a lípidos. Essas propriedades fazem da apoA-I um detergente potente, que forma complexos micelares estáveis com fosfolípidos, colesterol, triglicérides e colesterol esterificado. Os principais locais de síntese e secreção de apoA-I são o fígado e o intestino, sendo o fígado o principal contribuinte para o seu conteúdo plasmático (38).

A segunda principal apolipoproteína da HDL, a apoA-II, representa entre 15% e 20% da proteína total da partícula. Ela é mais hidrofóbica do que a apoA-I, e é predominantemente sintetizada no fígado mas também no intestino (44). Outras apolipoproteínas presentes na HDL incluem apoE, apoJ, apoM e apoC-II (41).

As partículas de HDL também carregam enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, incluindo a lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT), e enzimas com aparentes atividades antioxidantes, como o fator de ativação plaquetária acetil-hidrolase (PAF-AH) e a paraoxonase 1 (PON1). A LCAT é uma enzima plasmática que catalisa a esterificação do colesterol livre, que ocorre preferencialmente na superfície da HDL, onde a reação é ativada pela apoA-I (45). A PAF-AH é uma enzima hidrolítica independente de cálcio, que catalisa a hidrólise de fosfolípidos oxidados gerados a partir de componentes estruturais de membranas celulares e de lipoproteínas, como a LDL (46). A PON1, por sua vez, é uma enzima dependente de cálcio, capaz de catalisar a hidrólise de múltiplos compostos, incluindo fosfolípidos oxidados, ácidos graxos poli-insaturados oxidados, e peróxidos lipídicos específicos (47).

Dentre as proteínas de transferência associadas à HDL, a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) é uma glicoproteína associada à conversão da HDL em partículas maiores e menores, e ao seu papel no transporte extracelular de fosfolípidos (48). A CETP é uma glicoproteína hidrofóbica secretada principalmente pelo fígado, e atua na transferência de lípidos neutros, incluindo colesterol esterificado e triglicérides, entre lipoproteínas (49).

Além das proteínas, as partículas de HDL contêm diversas espécies moleculares de lípidos, sendo as quatro principais classes fosfolípidos, colesterol livre, colesterol esterificado e triglicérides (50). Análises de lipidômica recentes permitiram a identificação de mais de 200 espécies moleculares individuais de lípidos associadas à HDL (50, 51). Estruturalmente, as classes individuais de lípidos da HDL desempenham diferentes

funções: fosfolípidos constituem a monocamada lipídica da superfície da partícula, enquanto colesterol esterificado e triglicérides formam o núcleo lipídico hidrofóbico. Os esteróis livres estão localizados predominantemente na superfície, parcialmente penetrando o núcleo (52).

A fosfatidilcolina corresponde a aproximadamente 70% dos fosfolípidos da HDL, e é constituinte chave da estrutura das membranas celulares e das lipoproteínas. Ela pode ser de origem hepática, via formação da HDL nascente, ou extra-hepática, via ação da PLTP e da CETP nas lipoproteínas que contém apoB (52). A esfingomielina, por outro lado, é em grande parte entregue para HDL a partir de lipoproteínas ricas em triglicérides via transferência mediada pela PLTP, sendo que pouco se origina da HDL nascente (53). O conteúdo de esfingomielina é um fator crítico na determinação da pressão de superfície das membranas, aumentando a sua rigidez e, assim, influenciando a atividade de proteínas associadas (54, 55).

Fosfatidilinositol, fosfatidilserina e ácido fosfatídico são fosfolípidos secundários, de carga negativa, que podem impactar significativamente a carga de superfície da partícula da HDL (56), modulando sua interação com lipases, matriz extracelular e outros componentes proteicos (52).

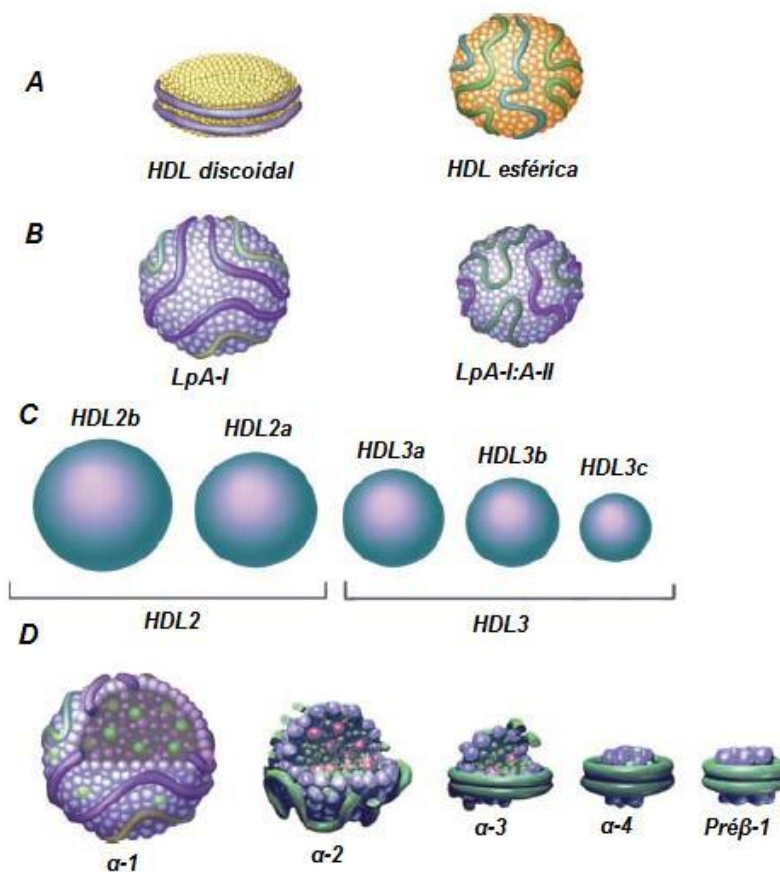
Colesterol esterificado é, em sua maior parte, formado na HDL plasmática como resultado da reação de trans-esterificação entre fosfolípidos e colesterol catalisada pela LCAT. Uma vez que este é altamente hidrofóbico, a reação da LCAT desloca o conteúdo de colesterol da superfície da partícula para o núcleo lipídico da HDL (52).

Os triglicérides da HDL são derivados de lipoproteínas que contém apoB como resultado da troca de colesterol esterificado mediada pela CETP. De forma semelhante ao colesterol esterificado, triglicérides são hidrofóbicos e fazem parte do núcleo da HDL; no entanto, eles formam uma fase mais fluida do que o primeiro (52).

A heterogeneidade das partículas de HDL plasmáticas é, em grande parte, resultado da estrutura altamente dinâmica da apoA-I, que permite diferentes conformações em função da quantidade de lípidos ligados e tamanho da partícula (57). Além disso, a capacidade de se ligar e carregar diferentes proteínas representa outro aspecto chave da heterogeneidade da HDL (40).

As diferenças mais óbvias entre as subpopulações de HDL são nas propriedades físicas, como forma e tamanho (Figura 3 A e C). Partículas discoidais, chamadas de pré- $\beta$  HDL, são pequenas, com diâmetro menor do que 8 nm, pobres em lípidos, com conteúdo lipídico inferior a 30%, e constituídas de apolipoproteínas, primariamente apoA-I, com pequenas quantidades de fosfolípidos e colesterol livre. Já as partículas esféricas de HDL são maiores, com diâmetro maior do que 8 nm, e contém, adicionalmente, um núcleo hidrofóbico de colesterol esterificado e triglicérides (37).

Além disso, devido à sua heterogeneidade em densidade, as HDL esféricas podem ser classificadas em duas subpopulações de HDL: HDL2 (densidade 1,063 – 1,125 g/mL), subfração leve, grande, rica em lípidos, e HDL3 (densidade 1,125-1,21 g/mL), subfração densa, pequena e pobre em lípidos (58). Estas podem, ainda, ser subfracionadas por ultracentrifugação por gradiente de densidade isopícnico em cinco subpopulações distintas de tamanho decrescente: HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b e HDL3c (Figura 3 C) (59).



**Figura 3. Heterogeneidade das partículas de HDL.** As principais subpopulações de partículas de HDL diferem em forma (A), composição de apolipoproteínas (B), densidade e tamanho (C), e mobilidade eletroforética (D). Adaptado de Kontush e Chapman (38).

Essas mesmas cinco subpopulações podem ser subfracionadas com base na heterogeneidade de mobilidade eletroforética, por eletroforese em gel de acrilamida não-desnaturante (Figura 3 D) (60). A carga livre da partícula pode ser medida por eletroforese em gel de agarose (61) e pela análise de potencial zeta em microeletroforese laser *Doppler* (62), e pode



fornecer informações importantes sobre as interações da HDL com parâmetros do metabolismo lipídico (63, 64).

As partículas de HDL podem, também, ser classificadas com base na sua composição de apolipoproteínas: partículas que contem apenas apoA-I ou tanto apoA-I quanto apoA-II (Figura 4 B) (58).

## 2.2. Metabolismo

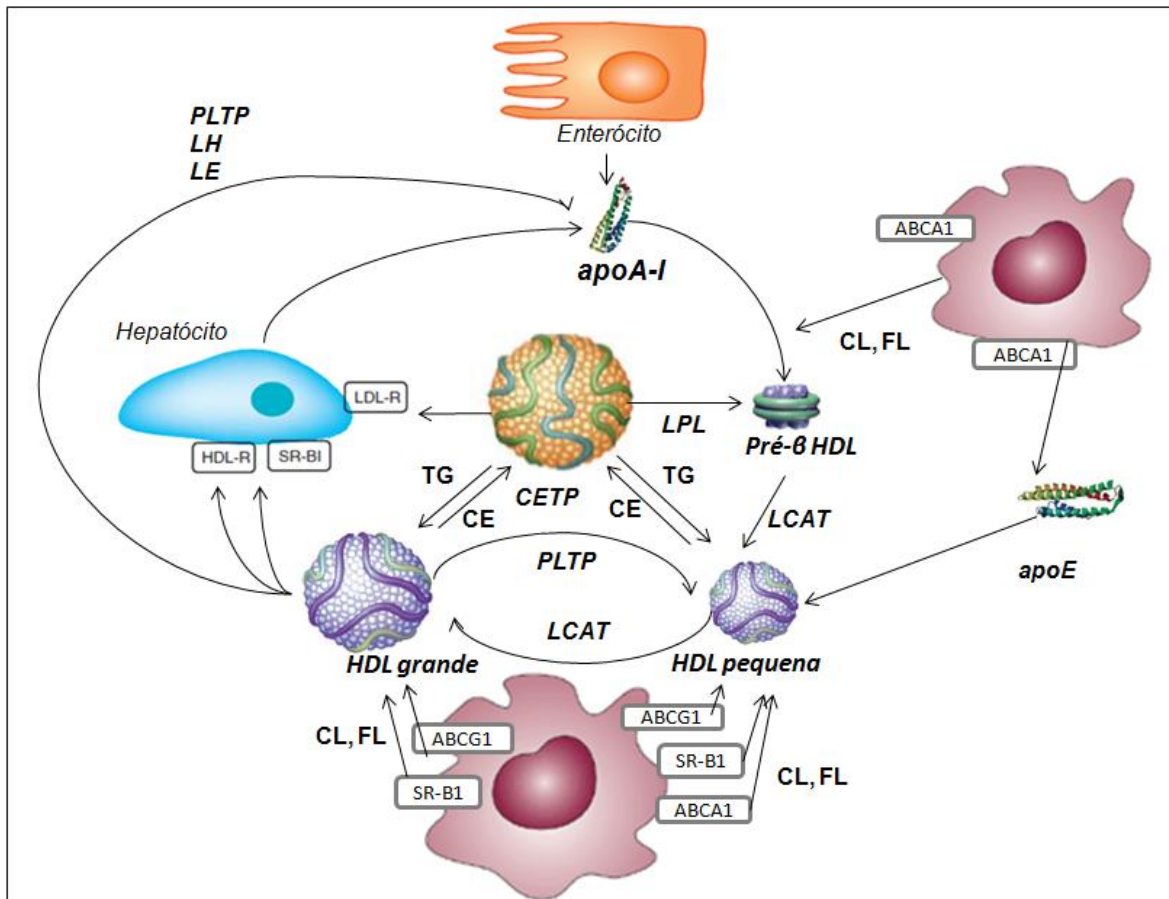
As partículas de HDL são constantemente remodeladas enquanto transportam colesterol e outros lípidos entre células e outras lipoproteínas (Figura 4). A maior parte da HDL plasmática está na forma de partículas esféricas, produzidas por processos intravasculares a partir de apoA-I livre de lípidos ou pré- $\beta$  HDL pobre em lípidos (65). Esses precursores pequenos de HDL são produzidos como HDL nascente pelo fígado ou intestino, e também são liberados como fragmentos de superfície após a lipólise de lipoproteínas ricas em triglicérides pela ação da lipoproteína lipase (LPL); finalmente, podem ser geradas durante a interconversão de HDL3 a HDL2 mediada pela PLTP (66). HDL pequenas e nascentes são instáveis e rapidamente adquirem lípidos (67); a lipidação inicial ocorre nas membranas celulares por meio do efluxo de colesterol e fosfolípidos mediado pelo “*ATP binding cassette transporter A1*” (ABCA1) (68).

Essas partículas de HDL discoidais são remodeladas pela ação de múltiplos fatores. Primeiramente, essas partículas continuam adquirindo lípidos celulares via ABCA-1. Além disso, representam um excelente substrato para LCAT: essa enzima transfere um

resíduo de ácido graxo da posição sn-2 da fosfatidilcolina para o grupo hidroxila do colesterol, resultando na formação de colesterol esterificado e lisofosfatidilcolina. Colesterol esterificado, extremamente hidrofóbico, se isola no núcleo das partículas enquanto elas são formadas, convertendo a HDL discoidal em partículas maiores e esféricas de HDL (38).

As partículas de HDL esféricas continuam adquirindo colesterol, preferencialmente via “*ATP binding cassette transporter G1*” (ABCG-1) e “*Scavenger Receptor Class B Type I*” (SR-BI), e podem ser remodeladas via fusão de partículas e transferência de remanescentes de superfície mediados pela PLTP (68). Além disso, partículas de HDL esféricas contendo apoE também podem ser formadas a partir de secreção de apoE por macrófagos (37).

Partículas esféricas grandes de HDL podem ser convertidas a partículas menores por meio da ação da CETP, que transfere colesterol esterificado da HDL para lipoproteínas que contêm apoB, e pela ação das enzimas plasmáticas lipase hepática (LH) e lipase endotelial (LE) (66). A troca de triglicérides de lipoproteínas que contêm apoB por colesterol esterificado da HDL por meio da ação da CETP gera HDL rica em triglicérides. Esta pode ser hidrolisada pela LH, formando partículas menores (69). Assim, esta ação conjunta da CETP com a LH promove uma redução no tamanho da HDL, formação de partículas de HDL pobres em lípidos, e a dissociação de apoA-I livre de lípidos, que pode interagir com ABCA1 no próximo ciclo de lipidação (70).



**Figura 4. Principais vias do metabolismo da HDL.** ApoA-I secretada pelo fígado e intestino se liga a fosfolípidos e colesterol livre via transportador ABCA1 para formar pré-β HDL. Lipólise de VLDL pela LPL é outra fonte importante para formação de pré-β HDL. Sob ação da LCAT nas pré-β HDL, a esterificação de colesterol gera partículas esféricas pequenas e grandes de HDL, as últimas sendo também remodeladas via fusão de partícula e transferência de fosfolípidos mediada pela PLTP. Partículas de HDL esféricas contendo apoE também podem ser formadas a partir de secreção de apoE por macrófagos. Partículas de HDL pequenas adquirem colesterol via efluxo de colesterol mediado por ABCA1, ABCG1 e SR-B1. Triglicérides de lipoproteínas que contem apoB (VLDL e LDL) são trocadas por colesterol esterificado (CE) na HDL pela CETP para gerar HDL rica em TG. As enzimas plasmáticas lipase hepática (LH) e lipase endotelial (LE) hidrolisam fosfolípidos da HDL, reciclando apoA-I que pode interagir com ABCA-1 no próximo ciclo de lipidação. Lípidos da HDL são catabolizados ou separadamente das proteínas da HDL por captação seletiva

via SR-BI, ou via transferência para lipoproteínas contendo apoB via CETP, ou como holopartículas juntamente com proteínas da HDL principalmente no fígado via captação por LDL-receptor para HDL contendo apoE e pelo até então não identificado receptor de holopartícula de HDL (HDL-R). Adaptado de Camont et al (37).

Lípidos da HDL podem ser catabolizados separadamente das proteínas da HDL por captação seletiva via SR-BI ou por transferência para lipoproteínas contendo apoB via CETP. A HDL pode ser, também, catabolizada como holopartícula principalmente no fígado via captação por LDL-receptor no caso de HDL contendo apoE, e pelo até então não identificado receptor de holopartícula de HDL (37).

## 2.3. Atividades Biológicas

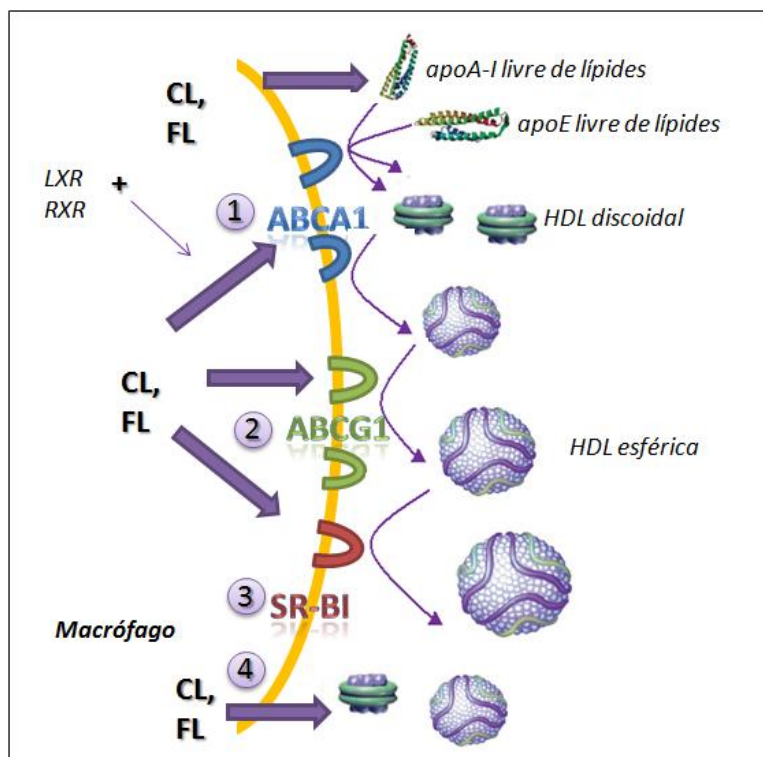
### 2.3.1. Capacidade de Efluxo de Colesterol

A HDL exerce um papel chave no transporte reverso de colesterol, no qual promove a remoção de colesterol dos tecidos periféricos, para posterior transporte para o fígado para excreção (71). A habilidade de remover colesterol das membranas das células periféricas é denominada capacidade de efluxo de colesterol, e representa o primeiro, e provavelmente essencial, passo da via do transporte reverso (38).

Durante o início do transporte reverso, a HDL precisa primeiro cruzar o endotélio para interagir com as células da intima arterial. Ou seja, o efluxo de colesterol das células para HDL não ocorre no compartimento plasmático, mas sim no espaço subendotelial das artérias. De forma importante, o endotélio não se comporta como uma barreira passiva e controla ativamente o tráfego de lipoproteínas entre os compartimentos intra e extravasculares (38).

Após a transcitose, o efluxo de colesterol pode ocorrer por diferentes mecanismos, representados na Figura 5. Estes mecanismos incluem 1. via unidirecional, dependente de ATP mediada pelo transportador ABCA-1; 2. via unidirecional, dependente de ATP mediada pelo transportador ABCG-1; 3. via bidirecional independente de ATP envolvendo SR-BI; e 4. difusão passiva independente de receptores, de acordo com gradiente de concentração de colesterol (72, 73).

Dentre esses mecanismos, a via mais estudada é a do efluxo de colesterol mediado pelo ABCA-1. De fato, função defeituosa do transportador ABCA-1 devido a causas genéticas reduz o efluxo de lípidos dependente de apoA-I (74), e está associada a déficits acentuados de HDL-C (75). As pré- $\beta$  HDL exercem um papel chave nesta via, demonstrado por estudo de Catalano et al. (76), no qual o plasma de homens saudáveis, pareados por idade, índice de massa corpórea (IMC), triglicérides, apoA-I e HDL-C, mostrou uma capacidade de efluxo de colesterol via ABCA-1 31% aumentada em relação às mulheres, associada a um aumento de 2,4 vezes nas concentrações plasmáticas de pré- $\beta$  HDL.



**Figura 5. Principais vias envolvidas no efluxo de colesterol mediado pela HDL.** 1. efluxo para apolipoproteínas livres de lípidos, como apoA-I e apoE, e para partículas discoidais pobres em lípidos, via ABCA-1; 2. efluxo para partículas esféricas de HDL via ABCG-1; 3. efluxo para partículas esféricas de HDL via SR-BI; 4. efluxo para todas as subpopulações de HDL via difusão passiva, de acordo com gradiente de concentração de colesterol. CL, colesterol livre; FL, fosfolípidos. Adaptado de Kontush e Chapman (38).

De um ponto de vista cinético, Chroni et al. (77) sugeriram um modelo de dois passos para o efluxo de colesterol via ABCA-1: primeiro, ocorre a formação de um forte complexo entre o ABCA-1 e seus ligantes, seguida pela lipidação da apoA-I e sua dissociação do complexo. Como esperado para um transportador que medeia a secreção de excesso de colesterol celular, a transcrição do ABCA-1 é fortemente induzida pelo aumento do conteúdo intracelular de colesterol. Essa indução ocorre por meio da ativação dos

receptores nucleares “*liver X receptors*” (LXR) tipo  $\alpha$  e/ou  $\beta$ , e “*retinoid X receptors*” (RXR), que formam heterodímeros e se ligam preferencialmente a elementos de resposta do gene promotor do ABCA-1, ativados por oxisteróis, gerados enzimaticamente a partir de colesterol e ácido retinóico, respectivamente (78).

Apesar do papel central do ABCA-1 no efluxo de colesterol, o ABCG-1 também é capaz de promover efluxo de colesterol de macrófagos, porém para partículas maduras de HDL (79-82). O mecanismo pelo qual este efluxo acontece não está, ainda, elucidado, mas dois potenciais mecanismos foram propostos. Em analogia ao proposto por Small (83) para os transportadores “*ATP binding cassette transporter G5*” (ABCG-5) e “*ATP binding cassette transporter G8*”(ABCG-8), o ABCG-1 poderia promover uma protrusão do colesterol da membrana plasmática seguida por uma colisão transitória com uma partícula de HDL. Alternativamente, o ABCG-1 poderia modificar a organização de fosfolípidos na membrana plasmática de forma que a membrana libere colesterol e fosfolípidos mais prontamente para os aceptores, de forma semelhante ao descrito por Tabas e Tall (84); este modelo é consistente com a natureza não específica e a falta de ligação de aceptores lipoproteicos do ABCG-1 (85). Em macrófagos, a transcrição de ABCG-1, assim como a de ABCA-1, é regulada pelo conteúdo intracelular de colesterol e/ou ação de agonistas de LXR (86).

Um fluxo bidirecional entre HDL madura e membranas plasmáticas também pode ser mediado pelo SR-BI, em uma via que envolve a ligação de partículas de HDL ao receptor com subsequente reorganização de lípidos dentro de domínios ricos em colesterol e cavéolas na membrana plasmática (87, 88). Consistente com essa observação, o plasma de

mulheres saudáveis, pareadas por idade, IMC, triglicérides, apoA-I e HDL-C mostrou uma capacidade de efluxo de colesterol via SR-BI 14% aumentada em relação aos homens, provavelmente resultado de um aumento de 20% nas concentrações plasmáticas de HDL2 (76).

Além disso, a difusão passiva de colesterol das membranas plasmáticas para partículas de HDL, independente de receptores, envolve a interação direta da HDL com a superfície da membrana, e pode contribuir para a remoção de colesterol das células, particularmente em condições basais, sem estímulos, já que, por não ser regulada positivamente, seu papel diminui com o aumento do conteúdo intracelular de colesterol (72).

#### *Papel dos componentes da HDL*

Tanto os componentes proteicos quanto lipídicos das partículas de HDL contribuem para sua capacidade de efluxo de lípidos celulares. Dentre as proteínas da HDL, a apoA-I predomina em termos de seu papel no efluxo lipídico, já que solubiliza e transporta colesterol e fosfolípidos, além de adotar uma conformação com alta afinidade por membranas em HDL pequenas, pobres em colesterol, facilitando, assim, o efluxo de colesterol (89). Após o enriquecimento com colesterol, uma mudança conformacional ocorre na apoA-I, que diminui sua afinidade por membranas, permitindo a liberação da partícula (89).



ApoA-II também pode agir como acceptor primário e remover de forma eficiente colesterol de macrófagos *in vivo* (90), além de outras apolipoproteínas, incluindo apoA-IV, apoC-I, apoE e apoM (66, 91, 92).

As concentrações de CETP parecem estar associadas à capacidade de efluxo de colesterol da HDL, uma vez que plasma de pacientes com altas concentrações de CETP apresenta capacidade 5,4% aumentada de efluxo de colesterol em relação à pacientes com baixas concentrações de CETP. Além disso, o impacto da CETP na capacidade de efluxo de colesterol se mostrou independente de fatores de risco clássicos e estilo de vida, assim como de parâmetros lipídicos incluindo HDL-C, LDL-C e triglicérides (93).

O papel dos lípidos no efluxo de colesterol mediado pela HDL também é importante. Eles fornecem um ambiente propício para a aquisição de moléculas de lípidos exógenas, principalmente colesterol, assim assegurando efluxo de lípidos celulares. Como consequência direta, propriedades dos lípidos de superfície da HDL podem impactar fortemente o efluxo (38). Primeiramente, a capacidade de efluxo de colesterol via SR-BI aumenta de forma dose-dependente com o aumento do conteúdo de fosfolípidos da HDL (94). Qualitativamente, a habilidade da HDL como acceptora de colesterol celular depende do estado físico dos fosfolípidos da superfície, e fosfolípidos insaturados formam as partículas acceptoras de colesterol mais eficientes (95).

#### *Heterogeneidade das partículas de HDL na capacidade de efluxo de colesterol*

A capacidade de efluxo de colesterol de diferentes subpopulações de HDL depende dos receptores envolvidos. As apolipoproteínas da HDL livres e/ou pobres em lípidos, principalmente a apoA-I, assim como partículas pequenas de HDLr semelhantes a pré- $\beta$ 1 HDL plasmática, induzem efluxo de colesterol via interação com ABCA-1 de forma potente e dose-dependente (96).

Partículas de HDL maduras promovem efluxo via ABCG-1 (96), e representam um ligante mais eficiente para captação de colesterol esterificado mediada por SR-BI comparada às partículas pequenas, pobres em lípidos (68). O maior conteúdo de fosfolípidos nas HDL grandes, que resulta em maior superfície lipídica, é provavelmente a razão pela qual HDL2 é mais potente do que a HDL3 no efluxo de colesterol via SR-BI (68). Em contraste, diferentes subclasses de HDL parecem ter a mesma capacidade como aceptores via difusão passiva, independente de receptores (68).

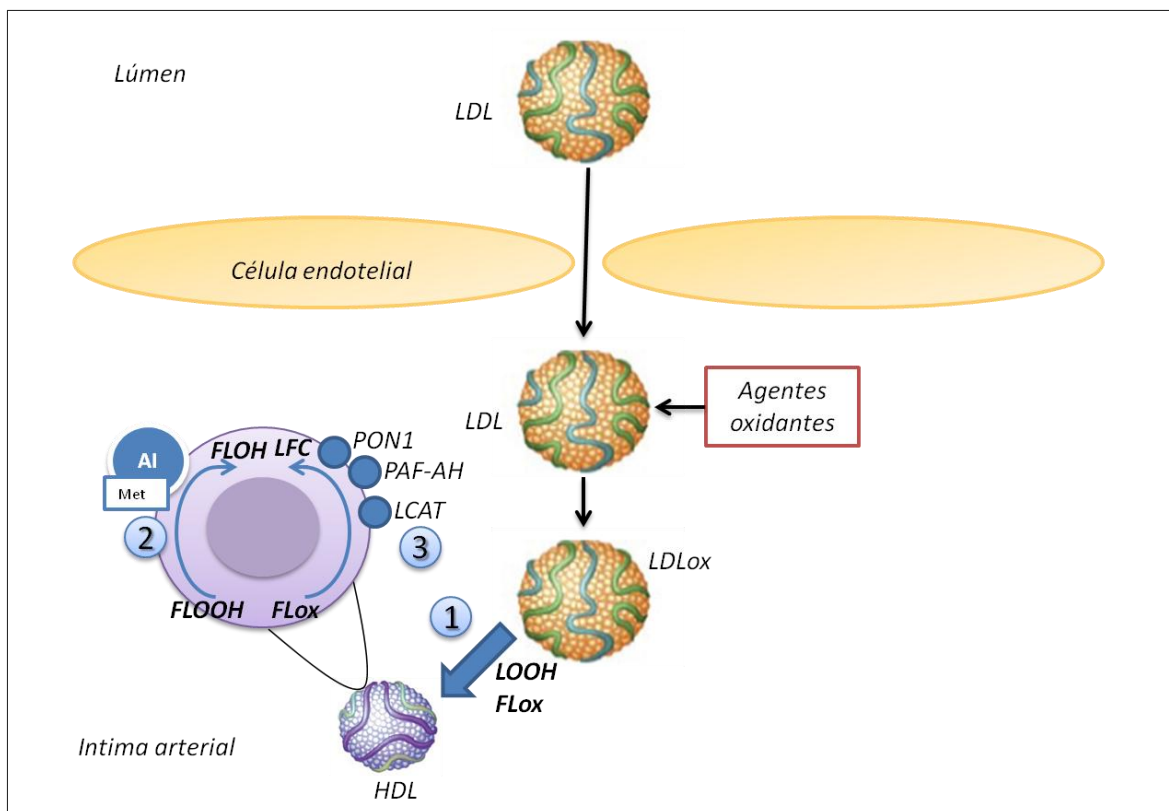
### 2.3.2. Atividade Antioxidante

A oxidação da LDL representa um fator importante nos estágios precoces do desenvolvimento da aterosclerose em humanos, papel destacado por achados recentes que mostraram que a remoção seletiva de LDLox da circulação pela superexpressão ectópica do “*lectin-like oxidized LDL receptor 1*” (LOX-1) no fígado previne completamente a progressão da doença em camundongos apoE “*knockout*”, apesar da dislipidemia grave (97).

A LDL é considerada o principal alvo fisiológico para a ação antioxidante da HDL, tipicamente medida *in vitro* como a inibição da oxidação da LDL pela HDL (5, 98, 99). Partículas de HDL protegem a LDL da oxidação por radicais livres, e inibem o acúmulo de produtos de oxidação tanto de proteínas quanto de lípidos, incluindo fosfolípidos oxidados, aldeídos de cadeia curta e resíduos de aminoácidos oxidados (98, 99). Essa capacidade protetora é mediada por diversos componentes da HDL e envolve vias moleculares distintas (100).

O primeiro passo da proteção da oxidação da LDL pela HDL consiste na remoção de lípidos oxidados da LDL (Figura 6, 1). De fato, hidroperóxidos fosfolipídicos são rapidamente transferidos da LDLox para HDL (101). Esta transferência pode ocorrer diretamente entre monocamadas de fosfolípidos das lipoproteínas, espontaneamente ou mediada por proteínas de transferência de lípidos, incluindo a CETP (102, 103). Esta capacidade da HDL de remover lípidos oxidados é regulada pela fluidez da monocamada lipídica da superfície da HDL: partículas com superfícies menos rígidas adquirem lípidos oxidados de forma mais eficiente, resultando em uma proteção mais potente da LDL contra o estresse oxidativo (101).

A inativação de lípidos oxidados associados à partícula de HDL representa o segundo passo na capacidade da HDL de proteger contra o dano oxidativo (100), e ocorre dependendo da sua estrutura. Hidroperóxidos lipídicos são reduzidos aos hidróxidos correspondentes (Figura 6, 2) (101, 102, 104), enquanto fosfolípidos oxidados tem sua atividade biológica inativada por meio da sua hidrólise a lisofosfolípidos (Figura 6, 3) (98, 99).



**Figura 6. Ação antioxidante da HDL na LDL.** HDL inibe a oxidação da LDL na intima arterial induzida por radicais livres, agindo via mecanismo que envolve: (1). A transferência de lípidos oxidados, como hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e fosfolípidos oxidados (FLox) da LDL para a HDL. (2). Redução dos hidroperóxidos de fosfolípidos (FLOOH) por meio dos resíduos metionina (Met) da apoA-I a hidróxidos de fosfolípidos redox-inativos (FLOH). (3). Hidrólise de FLox à lisofosfatidilcolina (LFC), catalisada pela ação das enzimas hidrolíticas associadas à HDL (PON1, PAF-AH e LCAT). Adaptado de Kontush e Chapman (38).

Além do seu efeito na inibição da oxidação da LDL, a HDL também é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuir o estresse oxidativo

intracelular *in vitro* em células endoteliais (105-107) e em macrófagos (108, 109), e *in vivo* em modelos animais de inflamação arterial aguda (110).

#### *Papel dos componentes da HDL*

A atividade antioxidante da HDL parece ser determinada por seu conteúdo lipídico e proteico, e está relacionada com a presença de diversas apolipoproteínas e enzimas com propriedades antioxidantes.

A ApoA-I tem um papel chave na proteção da LDL contra oxidação mediada pela HDL, que pode ser atribuído à sua habilidade de inativar hidroperóxidos lipídicos. Os resíduos metionina 112 e 148 da apoA-I podem reduzir estes hidroperóxidos em hidróxidos lipídicos redox-inativos, terminando, assim, a reação em cadeia da peroxidação lipídica (101, 104, 111). Essa reação redox é acompanhada pela formação de apoA-I oxidada, que contém sulfatos de metionina. Estes podem ser reduzidos de volta a metionina por meio da ação de metionina sulfóxido redutases, enzimas presentes em quase todos os tecidos, essenciais para a proteção das células contra o dano oxidativo (111). Além disso, apoA-I livre de lípidos atenua a oxidação da LDL pela remoção de moléculas de hidroperóxidos lipídicos da LDL (112).

Componentes enzimáticos potencialmente contribuem para as propriedades antioxidantes da HDL, e incluem PON1, PAF-AH e LCAT, todos os quais parecem hidrolisar fosfolípidos oxidados de cadeia curta, pró-inflamatórios (5, 113), mas são pouco reativos em relação a hidroperóxidos lipídicos (114-116).

Os lípides da HDL podem modular significativamente as atividades antioxidantes exibidas pelos componentes proteicos. Zerrad-Saadi et al. (101) mostraram que a rigidez da monocamada de fosfolípidos das partículas de HDL modula fortemente a eficiência da transferência de hidroperóxidos lipídicos da LDL para a HDL. Neste estudo, encontraram uma forte correlação inversa entre a taxa de transferência destes hidroperóxidos para lipossomas e a rigidez de membrana, e também, de forma importante, uma diminuição da transferência de hidroperóxidos da LDLox e da capacidade da HDL de reduzir a oxidação da LDL, paralela ao aumento da rigidez da superfície da HDLr.

A rigidez da monocamada da superfície da HDL é determinada principalmente pelo conteúdo relativo de lípidos como esfingomielina e colesterol livre, em relação à fosfatidilcolina e ácidos graxos saturados e insaturados, em relação aos poli-insaturados. O aumento do conteúdo de cada um deles enrijece a monocamada da superfície (101).

Finalmente, partículas de HDL podem carregar pequenas quantidades de antioxidantes lipofílicos, primariamente tocoferóis, que podem contribuir minimamente para as propriedades antioxidantes da HDL (50, 117, 118).

#### *Heterogeneidade das partículas de HDL na atividade antioxidante*

As partículas de HDL também são heterogêneas na sua capacidade de proteger a LDL do dano oxidativo induzido por radicais livres, o que pode ser atribuído à uma distribuição não uniforme de apolipoproteínas, enzimas e lípidos entre as partículas de HDL.

As partículas de HDL3, pequenas, ricas em proteína, agem como potentes protetores de LDL contra oxidação por meio da inativação de hidroperóxidos lipídicos, e inibem o acúmulo de produtos secundários de peroxidação lipídica, como aldeídos e fosfolípidos de cadeia curta (119). Consistente com esses dados, partículas de HDL3 parecem ser mais resistentes a modificações oxidativas em comparação à HDL2 (120).

Além disso, partículas de HDL3 podem ser igualmente superiores a HDL2 na sua capacidade de remover lípidos oxidados de outras lipoproteínas e membranas celulares. O conteúdo diminuído de esfingomielina e colesterol livre nas HDL pequenas e densas (121) pode resultar em aumento da fluidez da superfície da partícula, facilitando, assim, a incorporação de lípidos oxidados de origem exógena, como os derivados da LDLox (100). A hidrólise de fosfolípidos oxidados por enzimas hidrolíticas associadas a HDL também parece ser aumentada na HDL3, o que pode ser atribuído ao ser enriquecimento de atividades enzimáticas de PON1, LCAT e PAF-AH (119).

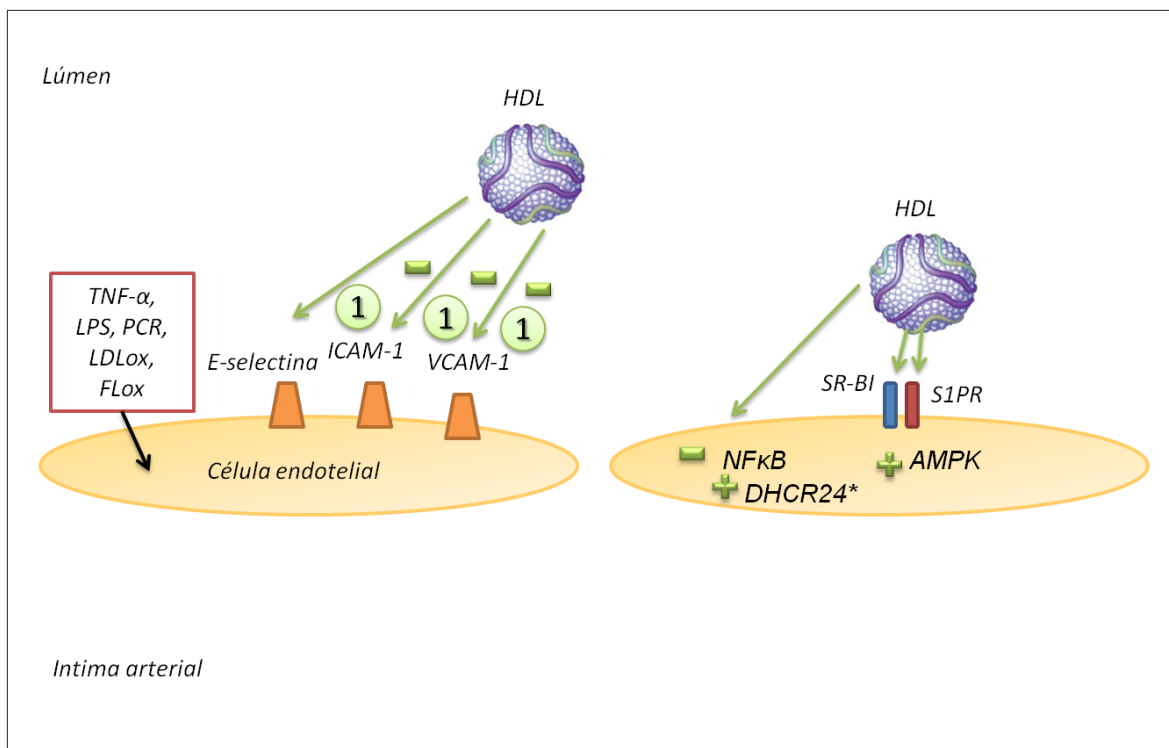
### 2.3.3. Atividade Anti-inflamatória

As partículas de HDL desempenham diversas ações anti-inflamatórias que contribuem para seus efeitos antiaterogênicos. Os principais efeitos ocorrem no endotélio, mas elas podem agir diretamente nos monócitos e outras células sanguíneas, sendo que as múltiplas formas de ação anti-inflamatória da HDL sugerem o envolvimento de diferentes mecanismos nesta atividade.

A HDL é capaz de reduzir a expressão de moléculas de adesão induzida por citocinas e a inibição de adesão dos monócitos. Shaw et al. (122) mostraram que a infusão intravenosa de uma única dose de HDLr (80 mg/kg) reduz significativamente a expressão de VCAM-1 em placas ateroscleróticas obtidas de pacientes com doença vascular periférica em um estudo placebo-controle. Além disso, a ativação de monócitos e concentrações circulantes de fator de necrose tumoral (TNF)-  $\alpha$  também foram reduzidas. Esta redução na inflamação foi acompanhada por uma redução significativa no conteúdo lipídico da placa, e tamanho diminuído de macrófagos. Concomitantemente, houve um aumento na capacidade de efluxo de colesterol de plasma sem apoB, junto com aumento das concentrações plasmáticas de HDL-C após a infusão. Assim, o conjunto destes achados sugere que um potencial mecanismo para esta função envolve o efluxo de colesterol celular, e consequente aumento do transporte reverso de colesterol nestes pacientes em resposta à HDLr.

Experimentos *in vitro* mostraram que partículas de HDL inibem de forma significativa a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina induzida por TNF- $\alpha$ , interleucina-1, endotoxina ou proteína C-reativa (Figura 7, 1) (123-126), e a secreção de MCP-1 induzida por LDLox nas células endoteliais (127). Estes processos poderiam limitar o processo inflamatório por meio da diminuição do recrutamento e adesão de monócitos/macrófagos na superfície endotelial. Esta ação da HDL envolve a modulação de múltiplos genes relacionados à proteção contra inflamação.





**Figura 7. Ação anti-inflamatória da HDL.** 1. HDL inibe a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) em células endoteliais ativadas por TNF- $\alpha$ , proteína C reativa (PCR), lipopolissacarídeo (LPS), LDL oxidada (LDLox) e fosfolípidos oxidados (FLox). 2. Essa ação se dá por meio da inibição da ativação de NF $\kappa$ B em células endoteliais induzidas por LDL oxidada e TNF- $\alpha$ , com subsequente redução da sinalização inflamatória. Esta ação intracelular envolve interação com SR-BI e receptores esfingosina-1-fosfato (S1P) e requer regulação positiva de DHCR24 e ativação de AMPK.

McGrath et al. (128) mostraram que habilidade da HDL de inibir a expressão de VCAM-1 e a adesão de monócitos depende da inibição da ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) pela HDL em células endoteliais ativadas. Esta inibição se dá por meio da via clássica de sinalização I $\kappa$ B quinase (IKK)/I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B, com a HDL suprimindo IKK, aumentando os níveis de I $\kappa$ B, e assim, suprimindo a translocação nuclear de NF $\kappa$ B. Este

mesmo estudo mostrou que esta inibição depende de um aumento nas concentrações da enzima 3-betahidroxiesteróide-delta 24-redutase (DHCR24), e que este aumento é dependente de SR-BI, uma vez que, o silenciamento de SR-BI leva a uma redução de DHCR24, e o silenciamento da expressão de DHCR24 levou a aumentos significantes de NFκB e VCAM-1 (Figura 7, 2).

Kimura et al. (129) mostraram que a inibição da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais mediada pela HDL também é dependente de ativação de proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que ocorre via interação da partícula com receptores esfingosina 1 fosfato e SR-BI, resultando na inibição da expressão da VCAM-1 (Figura 7, 2).

A atividade anti-inflamatória da HDL também pode envolver a remoção de lípidos oxidados de células endoteliais, macrófagos e/ou de LDLox, seguida pela inativação hidrolítica sob a ação das enzimas associadas a HDL (PAF-AH, PON1 e LCAT). O mecanismo dessa via se assemelha àquela envolvida na atividade antioxidante da HDL (98-100)). A relevância patofisiológica de fosfolípidos oxidados na aterosclerose se deve a suas potentes atividades pró-inflamatórias, que podem ativar a inflamação da parede arterial (130). A inativação destes agentes pró-inflamatórios pela HDL pode ser associada com reduzida expressão de moléculas de adesão e redução da adesão de macrófagos a células endoteliais (98, 131).

A HDL também pode limitar a propagação de resposta inflamatória como sugerido pela liberação atenuada de MCP-1, L-selectina solúvel, ICAM-1 solúvel e VCAM-1 solúvel de células THP-1 estimuladas com lipopolissacarídeo na presença de

apoA-I (132). Esta via pode estar associada à inibição da quimiotaxia de monócitos humanos mediada pela HDL (132).

#### *Papel dos componentes da HDL*

A habilidade da HDL de inibir a expressão de moléculas de adesão parece estar relacionada ao conteúdo de componentes proteicos e lipídicos específicos, incluindo apoA-I, apoA-II, apoA-IV e diferentes espécies moleculares de fosfolípidos, como esfingosina 1-fosfato e esfingosilfosforilcolina (126, 133, 134). Experimentos com infusão de HDLr contendo apenas apoA-I e fosfolípidos demonstraram que outros componentes não são essenciais para a capacidade da HDL de diminuir a resposta inflamatória *in vivo* (135), sendo a apoA-I o principal componente envolvido na atividade anti-inflamatória destas HDLr.

O papel de outras proteínas da HDL na sua atividade anti-inflamatória não foi muito investigado. A PAF-AH pode determinar a capacidade da HDL de restaurar o processo emigratório de células dendríticas derivadas de monócitos, resolvendo, assim, reações inflamatórias em placas ateroscleróticas (136). A PON1 pode assegurar inativação hidrolítica de fosfolípidos oxidados pró-inflamatórios (98, 99, 137). Por outro lado, a LCAT parece ter um papel oposto nas atividades anti-inflamatórias da HDL, já que concentrações circulantes de proteína C reativa estão correlacionada positivamente com atividade da LCAT em homens não-diabéticos sem doença cardiovascular (138).

Os lípides também podem estar envolvidos nas ações anti-inflamatórias da HDL. De fato, o conteúdo de lisoefingolípides da HDL inibe a expressão aórtica de MCP-1 (139). Além disso, 1-palmitoil-2-linoleoil fosfatidilcolina é capaz de inibir a sinalização pró-inflamatória via NFκB, e pode, assim, contribuir para a capacidade da HDLr de inibir a inflamação em cultura de células endoteliais (126, 140). Por outro lado, esfingosina 1-fosfato pode estar associada a uma atividade pró-inflamatória da HDL, como sugerido por seu efeito quimiotático em macrófagos (141).

#### *Heterogeneidade das partículas de HDL na atividade anti-inflamatória*

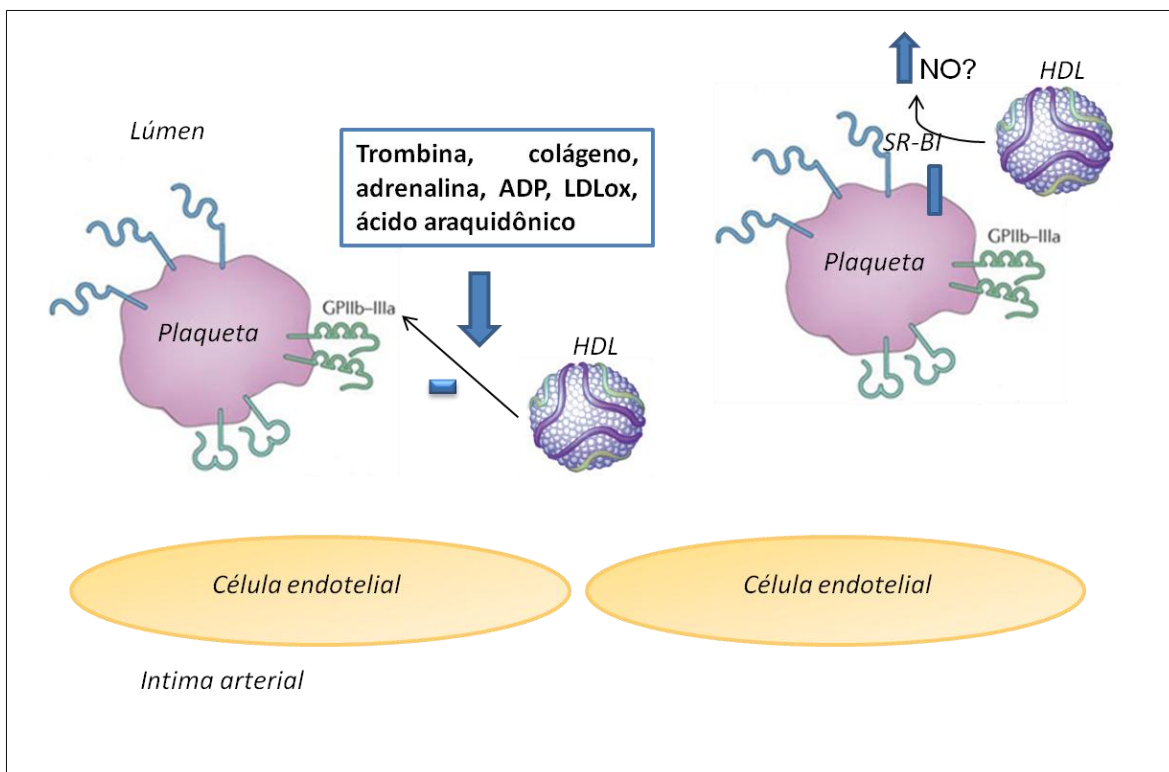
A potencial heterogeneidade da atividade anti-inflamatória da HDL ainda não está muito bem caracterizada. Estudos mostraram que a HDL3 parece ser superior do que a HDL2 em termos de capacidade de inibir a expressão de VCAM-1 em células endoteliais tanto com base em apoA-I como em colesterol total (142), o que poderia indicar uma propriedade anti-inflamatória aumentada da HDL3. Além disso, HDL esféricas são mais eficientes do que as discoides neste ensaio, enfatizando que a forma da partícula pode ser importante para a atividade anti-inflamatória (126).

#### 2.3.4. Atividade Antitrombótica

A HDL pode exercer efeitos antitrombóticos por meio de ação direta nas plaquetas (143). Calkin et al. (144) mostraram que a infusão de HDLr atenuou significativamente a resposta de agregação plaquetária *ex vivo* em resposta a múltiplos agonistas em sujeitos com diabetes tipo 2, caracterizados por capacidade de agregação plaquetária aumentada em relação a controles saudáveis; esse efeito foi acompanhado por um aumento transitório de HDL-C plasmática. *In vitro*, a HDL diminui a agregação plaquetária mediada pela glicoproteína IIb/IIIa em resposta a trombina, colágeno, ADP e adrenalina (145, 146) (Figura 8).

A produção aumentada de óxido nítrico (NO) foi relacionada à ação inibitória da HDL na agregação plaquetária (147), e pode ser iniciada pela interação da HDL com o SR-BI plaquetário (143) (Figura 8). No entanto, Valiyaveetil et al. (148) mostraram que a HDL oxidada, mas não a HDL nativa, tem efeitos inibitórios da ativação e agregação plaquetária induzida por agonistas fisiológicos. Esta ação depende do SR-BI plaquetário, mas não ocorre por meio do aumento da produção de NO, pela via eNOS/Akt.

Assim, os efeitos inibitórios da HDL na agregação plaquetária podem ser mediados pelo SR-BI, como indicado também pela ausência da inibição em plaquetas de camundongos deficientes em SR-BI (143) e na presença de ligantes para o SR-BI (149). Correlações negativas entre a expressão de SR-BI plaquetário e agregação *ex vivo* também colaboram para esta via (150).



**Figura 8. Ação antitrombótica da HDL.** Os efeitos da HDL nas plaquetas envolvem a redução na reposta de agregação plaquetária a múltiplos agonistas mediada pela glicoproteína IIb/IIIa (GpIIb/IIIa); estes agonistas incluem trombina, colágeno, adrenalina, adenosina difosfato (ADP), LDL oxidada (LDLox) e ácido araquidônico. Uma base proposta para esta ação da HDL é a produção aumentada de óxido nítrico (NO). Nas plaquetas, a geração de NO pode ser estimulada pela interação da HDL com o SR-BI.

Efluxo de colesterol aumentado de plaquetas, que resulta em menor conteúdo de colesterol nas membranas plaquetárias, diminuição da formação de microdomínios (*rafts*) lipídicos e estímulo da óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS), pode estar associado às ações benéficas da HDL na produção de NO e agregação plaquetária (144).

### *Papel dos componentes da HDL*

A atividade antitrombótica de HDL parece estar intimamente associada ao seu conteúdo em fosfolípidos, que aumenta o efluxo de colesterol das plaquetas, e reduz a formação de microdomínios (*rafts*) lipídicos (144). A fosfatidilserina e o fosfatidilinositol também podem contribuir para a capacidade da HDL de inibir a agregação plaquetária, agindo por meio do aumento da interação da HDL com o SR-BI (149).

### *Heterogeneidade das partículas de HDL na atividade antitrombótica*

A potencial heterogeneidade das atividades antitrombóticas entre as partículas de HDL é ainda indeterminada. Partículas de HDL2 contendo apoE parecem ser mais potentes do que a HDL3 em termos de sua capacidade de inibir a agregação plaquetária (151).

## 3. Justificativa

Evidências recentes sugerem que a qualidade da HDL, além das suas concentrações plasmáticas, pode estar associada ao risco cardiovascular. De fato, a capacidade de efluxo de colesterol celular está mais fortemente associada à presença de aterosclerose do que as concentrações plasmáticas de HDL em voluntários saudáveis(152). Possivelmente, outras funções protetoras da HDL, como antioxidante, anti-inflamatória e

anti-trombótica, podem estar igualmente mais associadas à aterosclerose ou risco cardiovascular do que HDL-C.

Assim, hipoteticamente, partículas de HDL disfuncionais presentes em indivíduos com doença aterosclerótica avançada poderiam impedir a estimativa de risco destes por meio da quantidade de HDL circulante. Neste contexto, indivíduos com hipoalfalipoproteinemia também poderiam apresentar alterações funcionais e fenotípicas na HDL associadas às concentrações plasmáticas reduzidas, e potencialmente papel ateroprotetor.



*Objetivos*



**Objetivo Geral:**

Verificar, em indivíduos sem doença cardiovascular pré-existente, se características fenotípicas ou funcionais da HDL se associam com a presença de hipoalfalipoproteinemia e com aterosclerose carotídea subclínica.

**Objetivos específicos:**

1. Caracterizar, em indivíduos com diferentes níveis de HDL-C, a composição química, diâmetro, potencial zeta, capacidade de efluxo de colesterol celular, funções antioxidante e anti-inflamatória, habilidade de inibir agregação plaquetária e suscetibilidade à oxidação da HDL.
2. Caracterizar, em indivíduos com ou sem aterosclerose carotídea subclínica, a composição química, diâmetro, potencial zeta, capacidade de efluxo de colesterol celular, funções antioxidante e anti-inflamatória, habilidade de inibir agregação plaquetária e suscetibilidade à oxidação da HDL.



*Capítulo*



**HDL-phospholipids and cholesterol efflux underlie the association between low HDL-cholesterol and atherosclerotic burden in primary prevention individuals**

**Abbreviated title:** Low HDL-cholesterol and Atherosclerosis

Natalia B Panzoldo<sup>1</sup> BSc, Eliane S Parra<sup>1</sup> BSc, Vanessa HS Zago<sup>1</sup> MSc, Isabela C Vieira<sup>1</sup> BSc, Felipe Vendrame<sup>1</sup> MSc, Erica IL Gomes<sup>1</sup> BSc, Edna R Nakandare<sup>2</sup> MD PhD, Eder CR Quintao<sup>2</sup> MD PhD, Eliana C de Faria<sup>1</sup> MD PhD, Andrei C Sposito<sup>3\*</sup> MD PhD

<sup>1</sup> Lipids Laboratory, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Sao Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Lipids Laboratory, Faculty of Medical Sciences of the University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Cardiology Division, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Sao Paulo, Brazil

**\*Corresponding author**

Professor Andrei C Sposito

Cardiology Division, Faculty of Medical Sciences,

State University of Campinas (Unicamp),

13084-971, Campinas, Sao Paulo, Brazil

Tel 55 191 3521 7098

Fax 55 19 3289 4107

Email: andreisposito@gmail.com

## Abstract

**Objective:** Investigate, in a primary prevention setting, whether HDL dysfunction is associated with hypoalphalipoproteinemia or atherosclerotic burden. **Methods:** Participants were classified as low (LH;  $\leq 32$  mg/dL; n=33), intermediate (IH; 40-67 mg/dL; n=33), or high HDL-cholesterol (HH;  $\geq 78$  mg/dL; n=35). We measured HDL chemical composition, particle size, cholesterol efflux capacity, antioxidant activity, susceptibility to oxidation, anti-inflammatory activity, and ability to inhibit platelet aggregation. **Results:** LH was associated to enhanced carotid intima-media thickness (IMT;  $p \leq 0.001$ ), high HDL-triglyceride ( $4 \pm 2\%$  vs.  $3 \pm 1\%$  in IH and  $3 \pm 1\%$  in HH,  $p \leq 0.001$ ), low HDL-phospholipids ( $12 \pm 4\%$  vs.  $14 \pm 5\%$  in IH and  $13 \pm 3\%$  in HH,  $p = 0.035$ ), decreased particle size ( $7.33 \pm 0.33$  nm vs.  $7.72 \pm 0.45$  nm in IH and  $8.49 \pm 0.42$  nm in HH,  $p \leq 0.001$ ), and reduced cholesterol efflux capacity ( $9 \pm 3\%$  vs.  $12 \pm 3\%$  in IH and  $11 \pm 4\%$  in HH,  $p \leq 0.001$ ). Carotid IMT  $> 1$  mm was associated with reduced HDL size ( $7.55 \pm 0.49$  nm vs.  $7.89 \pm 0.64$  nm,  $p \leq 0.001$ ), antioxidant activity ( $37(23)\%$  vs.  $49(42)\%$ ,  $p = 0.018$ ), and cholesterol efflux capacity ( $31 \pm 14\%$  vs.  $40 \pm 14\%$ ,  $p = 0.02$ ). No difference was found for the other HDL characteristics or functional properties. **Conclusion:** In the primary prevention setting, small particle size, reduced HDL-phospholipids content, and diminished cholesterol efflux capacity are related to both hypoalphalipoproteinemia and carotid IMT. In these individuals, these characteristics may underlie the association between HDL-cholesterol and atherosclerotic burden.

**ClinicalTrials.gov ID:** NCT02106013



## **1. Introduction**

A large amount of data has established that HDL protects against the incidence of cardiovascular events and this protective role has been largely attributed to several well-documented functions such as its ability to promote cholesterol efflux, to inhibit vascular inflammation, and to its antioxidant and antithrombotic properties (1). However, the inclusion of HDL-cholesterol (HDL-C) in risk evaluation results in only a small improvement in overall risk estimation in the general population (2). Also, as recently shown, the predictive value of HDL-C for cardiovascular mortality is weakened in the presence of coronary artery disease (CAD) (3) and interventions aimed at increasing HDL-C levels in patients with established CAD have not been associated with any clinical benefit (4). Besides, a recent Mendelian randomization study has showed that genetic mechanisms that increase HDL-C do not seem to reduce the risk of myocardial infarction (5).

Hypothetically, dysfunctional HDL particles would be largely present in individuals with advanced atherosclerotic disease preventing their risk estimation by the amount of HDL in the bloodstream. In the same context, individuals with hypoalphalipoproteinemia would also present functional impairment in HDL metabolism that underlies the decrease of both HDL concentration in plasma and atheroprotective role. In fact, cholesterol efflux capacity more strongly relates to atherosclerotic burden than plasma concentration of HDL particles in healthy volunteers (6). Possibly, other protective roles of HDL such as antioxidant, anti-inflammatory, and anti-thrombotic effects could equally bear a stronger association with atherosclerotic burden or cardiovascular risk than HDL-C. Hence, the aim of this study was to investigate the existence of association between the presence of

hypoalphalipoproteinemia or subclinical atherosclerotic disease and HDL chemical composition, physical-chemical characteristics, functions, and susceptibility to oxidation in a set of healthy individuals carefully selected from a large population database.

## **2. Methods**

### *2.1. Study subjects*

In order to select study participants, we evaluated 598,288 lipid profiles of consecutive individuals who spontaneously sought governmental primary care centers of the city of Campinas, SP, Brazil, between 2008 and 2011 (Flow diagram in Figure 1). In the first selection phase, we excluded individuals with: (i) LDL-cholesterol  $\geq 130$  mg/dL, (ii) TG  $\geq 150$  mg/dL, or (iii) age  $< 20$  or  $> 75$  years. As a result, 9% (53,491) were eligible for a telephone-based screening interview, which included verbal consent and a brief medical history questionnaire in order to exclude: (i) BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, (ii) self-reported medical conditions, (iii) smoking habit, (iv) daily intake of alcohol  $> 14$ g, or (v) regular use of medical treatments. Following the telephone interview, 1,536 subjects were selected by the abovementioned criteria and were invited to undergo in-person clinical evaluation and blood exams to confirm and complement the clinical data. During this evaluation we excluded subjects who had: (i) BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, and (ii) glucose  $> 100$  mg/dL, (iii) urea  $> 71$  mg/dL, (iv) creatinine  $> 1.20$  mg/dL, (v) uric acid  $> 7.0$  mg/dL, (vi) alanine aminotransferase  $> 50$  U/L, (vii) aspartate aminotransferase  $> 33$  U/L, (viii) gamma-glutamyl transferase  $> 71$  U/L, (ix) alkaline phosphatase  $> 129$  U/L; (x) thyroid stimulating hormone  $< 0.41$  or  $> 4.50$   $\mu$ UI/mL, (xi) free thyroxine  $< 0.9$  or  $> 1.8$  ng/dL, or (xii) metabolic syndrome

as defined by the International Diabetes Federation criteria (7). From 312 individuals who were considered eligible by the abovementioned criteria those with HDL-C below the 10<sup>th</sup> percentile (HDL-C  $\leq$ 32mg/dL, n=33), between 40<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> percentiles (40 $\leq$ HDL-C $\leq$ 67mg/dL, n=33) or above the 90<sup>th</sup> percentile (HDL-C  $\geq$ 78mg/dL, n=35) were enrolled. They were classified as low HDL-C (LH), intermediate HDL-C (IH) and high HDL-C (HH). Sample size was estimated based on the cholesterol efflux values obtained by Khera et al. (6), considering an alpha value of 0.05 and beta of 0.8 two-sided. In order to do so, the sample size would be 50. The study was approved by the Institutional Ethics Committee (1260/2010) and all participants signed a written informed consent.

## *2.2. Biochemical analyses*

Blood samples were drawn after a 12-hour fasting period. Serum and EDTA plasma were separated by centrifugation and stored at -80°C until analyses. Glucose, TG and HDL-C were measured in an automated Modular® Analytics Evo (Roche Diagnostics, Burgess Hill, West Sussex, UK), using Roche Diagnostics® reagents (Mannheim, Germany). LDL-cholesterol was calculated by the Friedewald formula. C-reactive protein (CRP) was measured by immunoturbidimetry (Tina-quant CRP detection method, Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany). Serum insulin levels were measured using the Human Insulin ELISA kit (Cat number EZHI-14K, Millipore, Massachusetts, USA). The Homeostasis Model Assessment (HOMA) Calculator version 2.2 (University of Oxford, UK) was used to estimate insulin sensitivity (HOMA2S%) (8). Apo A-I and B-100 and lipoprotein (a) were determined by nephelometry in a BNII automated system and reagents from Dade-Behring® (Marburg, Germany).

### *2.3. Carotid artery ultrasound*

Carotid artery atherosclerosis was estimated by using high-resolution B-mode ultrasound (ATL HDI 1500 and 3500 equipped with a 6-9 MHz linear transducer, Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, EUA), by a single trained sonographer, according to standardized method (9). Bilateral measurements of the intima-media thickness (IMT) were made at the posterior wall of the common carotid artery, 1 cm below the bifurcation. Mean IMT was calculated as the average of five measurements.

### *2.4. Lipoprotein isolation*

LDL was isolated from a pool of normolipidemic sera from 20 volunteers, through sequential ultracentrifugation using a Beckman L8-M ultracentrifuge (Beckman Coulter Inc., Palo Alto, USA), with a 75Ti fixed angle rotor (10). HDL was isolated from each study participant through density gradient ultracentrifugation (11) with the use of a SW41Ti rotor. Isolated lipoproteins were extensively dialyzed against EDTA-free PBS for 24h, at 4°C, in a dark room. All assays were performed in freshly isolated lipoproteins that were kept at 4°C for a maximum period of 15 days.

### *2.5. HDL chemical composition and molar concentration measurements*

HDL chemical composition was measured using commercially available enzymatic kits, in the microplate reader Power Wave XS (BioTek®, Winooski, USA). Total proteins (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, USA); total cholesterol (TC) (CHOD-PAP, Roche Diagnostics® reagents, Mannheim, Germany), free cholesterol (FC) (Free Cholesterol E, Wako Chemicals, Richmond, USA), phospholipids (PL) (Phospholipids C, Wako Chemicals, Richmond, USA), TG (TG, GPO-PAP, Roche

Diagnostics® reagents, Mannheim, Germany) and apoA-I (TINA QUANT APO A1 V2, Roche Diagnostics® reagents, Mannheim, Germany) were measured, while cholesteryl ester (CE) was calculated according to the following formula:  $(TC - FC) \times 1.67$  (11). The relative content of apo A-I (HDL-ApoA-I) or lipids in HDL was calculated based on their proportion to the total mass of HDL, calculated as the sum of FC, PL, TG, CE, and total proteins. HDL molar concentration was estimated based on particle total mass and molecular weight (11).

#### *2.6. HDL physical-chemical characterization*

HDL particle size was determined using dynamic light scattering, in a Nanotracs Particle Size Analyser 250 (Microtrac Inc., Montgomeryville, USA) (12). Zeta potential was determined in HDL diluted 1:10 in KCl 10mM, using laser Doppler micro-electrophoresis, in the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK).

#### *2.7. Determination of proteins involved in HDL metabolism*

Cholesteryl ester transfer protein (CETP) and phospholipids transfer protein (PLTP) activities were measured using exogenous radiometric assays, as previously described (13, 14). LPL and hepatic lipase (HL) activities were measured in fasted post-heparin plasma samples, collected 15min after the intravenous administration of heparin (100U/kg body weight), in an assay based on fatty acid release from a radiolabeled triolein emulsion (15). LCAT activity was determined using recombinant HDL, according to standardized method(16).

#### *2.8. HDL antioxidant activity and susceptibility to oxidation*

HDL antioxidant activity and susceptibility to oxidation were measured in a kinetic fluorimetric assay adapted from Navab et al (17). Oxidation was monitored as changes in the fluorescence intensity of 2',7'-dichlorofluoresceine (DCFH). For the antioxidant activity assays, LDL (final concentration, 20mgTC/dL) and CuSO<sub>4</sub> (final concentration, 0.5μM) were added to DCFH-containing tubes (final concentration, 2mg/mL), followed by the addition or not of HDL (final concentration, 15mg total mass/dL). To measure HDL's susceptibility to oxidation, HDL was incubated with CuSO<sub>4</sub> and DCFH in the absence of LDL. The volume was adjusted to 100μL with Chelex treated-PBS and the reaction mixture transferred onto a black 96-well microplate. The plate was covered with an optical adhesive cover to avoid evaporation and incubated at 37°C. Fluorescence intensity was measured over 24h with 15 minute intervals in a fluorescence microplate reader (Spectra Max M5; Molecular Devices, Sunnyvale, USA) at an excitation wavelength of 485nm, emission wavelength of 540 nm, and cut-off of 530nm. Results of antioxidant activity are presented as the percentage of inhibition of LDL oxidation in the presence of each subject's HDL and susceptibility to oxidation as percentage of HDL oxidation, when compared to control wells (LDL alone).

### *2.9. HDL anti-inflammatory activity*

HDL's anti-inflammatory activity was measured in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in an assay adapted from Besler et al(18). Cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum, penicillin, and streptomycin and maintained in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. After reaching confluence, they were plated in 24-well culture plate (0.3 x 10<sup>5</sup> cells/mL), and incubated with TNF-α (1ng/mL), with or

without HDL (50µgApoA-I/mL) for three hours. The culture media were collected and stored at -80°C. Due to the low vascular cell adhesion molecule -1 (VCAM-1) concentrations, samples were concentrated using the Amicon® Ultra Centrifugal Filters, 50K (Millipore, Massachusetts, USA) and then VCAM-1 concentrations were measured using the Human VCAM-1 ELISA Kit (Cat number ECM340, Millipore, Massachusetts, USA). Results are expressed as the percentage of decrease in VCAM-1 concentrations in the wells incubated with HDL when compared to the control wells without HDL.

#### 2.10. *Cellular Cholesterol Efflux*

Global cellular cholesterol efflux was measured in J774 macrophages enriched with acetylated LDL and <sup>14</sup>C-cholesterol, using HDL as the cholesterol acceptor, as described by Machado-Lima et al (2013) (19). Briefly, J774 macrophages were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum, penicillin, and streptomycin and maintained in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. After reaching confluence, cells were plated in a 96-well plate ( $1.25 \times 10^5$  cells/mL), and enriched with acetylated LDL (50µg/mL) and <sup>14</sup>C-free cholesterol (0.3µCi/mL). After 48 h, cells were washed with PBS containing fatty acid-free albumin (FAFA) and equilibrated with DMEM containing FAFA for 24 hours. The cells were then washed twice and incubated with HDL (50µg apoA-I/mL) for 8 hours. Media were collected and the radioactivity measured in a beta-scintillation counter. Cells were rinsed twice with cold physiologic saline and the intracellular lipids extracted with hexane:isopropanol (3:2, v/v). Solvent was evaporated and radioactivity measured. The percentage of <sup>14</sup>C-cholesterol efflux was calculated as (<sup>14</sup>C-cholesterol in the medium/<sup>14</sup>C-cholesterol in cells + medium) × 100.

### 2.11. *Platelet aggregation inhibition*

HDL's ability to inhibit platelet aggregation was measured as described by Valiyaveetil et al (20). HDL (0.8mg protein/mL) was mildly oxidized by dialysis against PBS + 5 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, for 24h at 37°C. Citrated blood was drawn from a healthy donor and platelet-rich plasma (PRP) obtained by centrifugation at 800rpm for 15 minutes. PRP was then incubated with native or oxidized HDL (0.5 mg/mL) for 30 minutes at 37°C. Platelet aggregation was monitored using a Lumi-Aggregometer type 500 VS (Chrono-log, Havertown, USA) for 6 minutes after the addition of ADP (5 $\mu$ M). Results are expressed as percentage of the inhibition of platelet aggregation induced by oxidized compared to native HDL.

### 2.12. *Statistical Analyses*

Normally distributed data are presented as mean  $\pm$  standard deviation and non-normal data as median (interquartile range). Log transformation of the following parameters was applied in order to use parametric tests: TG, lipoprotein(a), CRP, LPL, insulin, and HOMA2S%. Afterwards, the Log transformation normality was confirmed by Kolmogorov-Smirnov test. Differences between groups were evaluated using ANOVA or Kruskal-Wallis, with Bonferroni's post-hoc multiple comparison analysis, according to variable distribution. Chi-Square was used to compare categorical data. Analysis of covariance (ANCOVA) adjusted for gender and age was used to compare IMT between groups. ANCOVA adjusted for gender, age, and HOMA2S% was used for cholesterol efflux, antioxidant activity, anti-thrombotic activity, and susceptibility to oxidation. HOMA2S% was selected for adjusting due to the difference between groups. ANCOVA



was performed after checking these variables with histograms, normality plots, and residual scatter plots that tested for linearity, normality, and variance. Pearson's correlation test was used to assess the relationships between normally distributed variables. A two-sided  $p$ -value of 0.05 was considered significant. SPSS software version 11.5 was used for all analysis.

### **3. Results**

#### *3.1. Study subjects characteristics*

As shown in Table 1, LH group presented higher frequency of male gender, BMI, waist circumference, TG, and LCAT activity as well as lower HOMA2S% when compared to both IH and HH individuals. In comparison to the HH group, LH individuals had higher CRP and HL. HH presented higher HL activity than LH. Importantly, LH group was also characterized by significantly increased IMT. This difference in IMT remained significantly associated with reduced HDL-C after adjusting for HOMA2S% ( $p \leq 0.001$ ).

#### *3.2. HDL chemical composition and physical-chemical characteristics*

Besides the expected difference in HDL-C concentration, the three groups also differed significantly in particle chemical composition and physical-chemical characteristics (Table 2). HDL size increased significantly from LH to IH and from IH to HH. Total mass and, consequently, molar concentration were significantly higher in HH than LH and IH. When compared to HH, LH presented higher TG (HDL-TG) and lower FC (HDL-FC) content. LH presented lower CE (HDL-CE) and higher total proteins (HDL-TP) relative contents than both HH and IH. This group also presented lower PL (HDL-PL)

relative content when compared to IH. The HH group had significantly increased FC to PL ratio than compared to LH and IH (HH=  $0.25 \pm 0.06$ , IH=  $0.20 \pm 0.06$ , LH=  $0.19 \pm 0.08$ ,  $p \leq 0.001$ ).

### *3.3. Antioxidant activity of HDL*

Antioxidant activity was significantly lower in HH than in LH (Table 3). This difference remained significant after adjusting for age, gender, and HOMA2S% ( $p=0.006$ ). Since the antioxidant activity was inversely related to HDL size ( $r=-0.37$ ;  $p=0.001$ ), we also adjusted for HDL size. Still, the antioxidant capacity remained significantly lower in HH as compared to LH groups ( $p=0.005$ ). Importantly, when calculated as a function of HDL molar concentration in plasma, this difference was no longer significant ( $p=0.428$ ).

### *3.4. HDL susceptibility to oxidation*

HH presented higher susceptibility to oxidation when compared to IH and LH (Table 3). When we adjusted for age, gender, and HOMA2S% the difference lost statistical significance ( $p=0.13$ ). There was no significant association between HDL phenotype and HOMA2S% or age but female gender presented a bigger HDL size than man ( $8.01 \pm 0.62$  vs.  $7.64 \pm 0.59$ ;  $p=0.003$ ). Consistently, the frequency of female gender was higher in HH group (Table 1).

### *3.5. Anti-inflammatory activity of HDL*

Anti-inflammatory activity as a continuous variable was not significantly different between the three groups (Table 3). In order to confirm this finding, we also compared the frequency of individuals without reduction in VCAM-1 concentrations after HDL co-incubation (LH=33%, IH=31%, HH=29%,  $p=0.913$ ) and the frequency of those with anti-

inflammatory activity above the 75<sup>th</sup> percentile (LH= 24%, IH= 28%, HH = 23%, p= 0.872), and found no differences between the three groups.

### *3.6. Cholesterol efflux to HDL*

The capacity of isolated HDL to mediate cellular free cholesterol efflux was diminished in LH when compared to IH and HH (Table 3). This difference remained significant after adjustments for age, gender, and HOMA2S% (p= 0.005).

Cholesterol efflux capacity was also recalculated in terms of HDL-PL or as a function of molar concentration. We found that, normalized for molar concentration, cholesterol efflux was still significantly lower in LH than in IH and HH (LH= 31 ± 15 %, IH=43 ± 13 %, HH=42 ± 15 %, p= 0.001). When normalized for HDL-PL, efflux differences were no longer significant (LH=6 ± 5 %, IH=6 ± 3 %, HH= 6 ± 2 %, p= 0.883).

### *3.7. Platelet aggregation inhibition*

HDL's ability to inhibit platelet aggregation was significantly higher in HH than in IH (Table 3). After adjustments for age, gender, and HOMA2S%, this difference remained significant (p= 0.002). No significant correlations were found between platelet aggregation inhibition and particle size, molar concentration, zeta potential, HDL-TP, HDL-FC, HDL-PL, HDL-CE, HDL-ApoA-I, HDL-TG, or susceptibility to oxidation.

### *3.8. HDL characteristics and atherosclerosis*

In order to evaluate the relationship between HDL characteristics and subclinical atherosclerosis, we performed ANCOVA analyses adjusted for age, gender, and HDL-C in subjects classified according to IMT above the 90<sup>th</sup> percentile (1 mm). We found that individuals with IMT above 1mm presented significantly reduced molar adjusted

cholesterol efflux, antioxidant activity, HDL size, and HDL molar concentration (Table 4). We repeated this analysis using HDL-PL instead of HDL-C for adjusting and the abovementioned characteristics remained significantly different except for molar adjusted cholesterol efflux ( $p=0.142$ ).

#### **4. Discussion**

This study was designed to verify if functional properties of HDL would contribute to the propensity for atherosclerosis among individuals with hypoalphalipoproteinemia. Indeed, even in a cohort of healthy volunteers, we confirmed that low HDL-C is associated to enhanced IMT. Our major findings are that LH individuals present: (i) increased HDL-TG and decreased HDL-PL, HDL-FC, and HDL-CE, (ii) decreased particle size, and (iii) reduced cholesterol efflux capacity. The difference in cholesterol efflux lost significance when adjusted as a function of HDL-PL, suggesting a significant role of phospholipid content for this functional impairment.

Despite of metabolic syndrome being used as exclusion criteria in this study, we found that LH individuals presented a higher frequency of increased waist circumference, higher plasma levels of TG, CRP and insulin, and decreased insulin sensitivity. Consistently, despite having equivalent exogenous CETP activity, the HDL size and cholesterol content were decreased and the TG content increased in the LH group, which is likely to be determined by the increased plasma availability of TG-rich lipoproteins (21). In addition, we found an increased plasma LCAT activity in LH individuals, which has been reported to be associated to metabolic syndrome and attributed to insulin resistance (22).

This increased exogenous LCAT activity is not associated to increased HDL-CE in this group, which could be explained by the diminished cholesterol content of their particle, resulting in less substrate for this enzyme. In spite of that, the difference in IMT remained significantly associated with reduced HDL-C after adjusting for HOMA2S%, suggesting that additional elements must contribute for the increased atherosclerotic burden in these subjects.

Recent evidence has indicated that HDL functional properties and particle characteristics may have a higher predictive value for atherosclerotic disease than HDL-C plasma concentration. In fact, we found that HDL antioxidant activity, cholesterol efflux capacity, HDL molar concentration, and particle size were reduced in subjects with  $IMT > 1mm$ . Among the examined functional properties of HDL, we identified a decreased cholesterol efflux in LH individuals even when recalculated as a function of HDL molar concentration and adjusted for insulin sensitivity. Importantly, decreased cholesterol efflux has been strongly associated to increased IMT in healthy individuals and with the presence or severity of coronary artery disease (CAD) independently of HDL-C plasma concentration (6, 23). Surprisingly, in one study, patients in the higher tertile of efflux capacity presented higher risk of incident myocardial infarction, stroke, or death in a 3-year period, which remained significant after adjustments for traditional cardiovascular risk factors (23). Although the confirmation of this finding is still required, we may infer that cholesterol efflux capacity may be more strongly related with atherosclerotic burden rather than incidence of cardiovascular events (24). Likewise, plasma CRP has also been strongly associated to the incidence of cardiovascular events (25), but weakly or even not related to

atherosclerotic burden (26). Consistently, in our study, low cholesterol efflux was associated to increased IMT, but not correlated with CRP.

We found that the difference in cholesterol efflux between individuals with hypoalphalipoproteinemia and those with normal or high HDL-C was no longer significant when recalculated in terms of HDL-PL. This finding is consistent with the concept that HDL-PL is a main determinant of cholesterol efflux capacity (27-29). Indeed, individuals subjected to a phospholipid-enriched diet presented increase in HDL-PL content, which was associated to the increase in cholesterol efflux (30). By inference, we may suppose that HDL-PL would improve risk stratification in primary prevention as compared with HDL-C. This assumption must be considered in prospective clinical studies.

We also found that individuals with HDL-C >78 mg/dL had lower HL activity, increased HDL size, and decreased HDL antioxidant activity. The lower HL activity might have contributed for their increased HDL-C levels and size (31). Kontush et al (32) have also shown that the ability of HDL to inhibit LDL oxidation *in vitro* is impaired in subjects with elevated levels of HDL-C. Such phenomena could be partially explained by the increased HDL size in this group since small HDL particles seem to act as the most potent inhibitors of LDL oxidation (33). Also, in line with a prior report (34), we found a higher FC to PL ratio among HH individuals, which may decrease HDL membrane fluidity and, by this way, decrease oxidized lipids transfer to HDL. Since oxidized lipids must first be transferred from LDL to HDL in order to be inactivated, such a composition change would contribute to the decreased antioxidant capacity in HH individuals. However, the increase

in the number of HDL particles compensated the overall antioxidant capacity of HH individuals, calculated as a function of HDL molar concentration.

The intensity of platelet aggregation is abundantly demonstrated as a risk factor for cardiovascular events and may constitute a link between HDL particles and the incidence of atherothrombotic episodes. Indeed, *in vivo* oxidation of HDL particles is a way of turning HDL particles into an effective inhibitor of platelet aggregation (35). Valiyaveetil et al (20) have shown that oxidized HDL is able to inhibit platelet aggregation in response to physiological agonists in a scavenger receptor-class B type I (SR-BI)-dependent manner. We found that HH individuals have increased ability to inhibit platelet aggregation, which is likely to result from their HDL susceptibility to oxidation. Besides, larger HDL particles, as found in HH, are known to better interact with SR-BI (36), which could also be associated to their increased ability to inhibit platelet aggregation. Since oxidized HDLs may be present in any clinical condition associated with oxidative stress, our findings suggest that the anti-platelet aggregation effect of HDL must be considered among the potential links between HH and reduced incidence of cardiovascular events.

The study has some limitations that must be borne in mind for its correct understanding. Firstly, although we carefully excluded from almost 600,000 individuals those with IDF-based criteria for metabolic syndrome, a slight decline in insulin sensitivity was found and was inversely proportional to plasma HDL-C. Eventhough we adjusted the analyses for HOMA2S, it is still possible that some of the features attributed to low HDL-C could be influenced by this metabolic impairment. Decrease of HDL concentration in plasma has been directly implicated in the decrease in insulin sensitivity in animal

models(37) and clinical studies (38). Thus, impairment of insulin metabolism is probably an intrinsic and expected component of hypoalphalipoproteinemia.

In conclusion, we found that healthy subjects with low HDL-C levels or increased subclinical carotid atherosclerosis are characterized by smaller HDL particles with decreased phospholipids content and diminished cholesterol efflux capacity, a phenotype that could be related to their increased atherosclerotic burden.

### **Conflicts of interest**

None.

### **Funding**

Natália B. Panzoldo was supported by a doctoral grant (number 2012/01645-2) from the Foundation for Research Support of the State of Sao Paulo (FAPESP). Prof Sposito was supported by a fellowship grant of productivity in research from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant number 300313/2007-1). The study was funded by FAPESP (grant number 2006/60585-9) and CNPq (grant number 471380/2008-13).

### **Acknowledgements**

We are grateful to Prof Matti Jauhiainen and Jari Metso from the National Institute for Health and Welfare, Helsinki, Finland for the analyses of PLTP and LCAT activities, and to Prof Joyce Maria Annichino Bizzacch, Prof Erich de Paula and Tânia Machado for the



support and use of the laboratory facilities for platelet aggregation assays in the Hematology and Hemotherapy Center, Unicamp.

## References

1. Rye, K. A., and P. J. Barter. 2014. Cardioprotective functions of HDLs. *J Lipid Res* **55**: 168-179.
2. Cooney, M. T., A. Dudina, D. De Bacquer, A. Fitzgerald, R. Conroy, S. Sans, A. Menotti, G. De Backer, P. Jousilahti, U. Keil, T. Thomsen, P. Whincup, and I. Graham. 2009. How much does HDL cholesterol add to risk estimation? A report from the SCORE Investigators. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **16**: 304-314.
3. Silbernagel, G., B. Schottker, S. Appelbaum, H. Scharnagl, M. E. Kleber, T. B. Grammer, A. Ritsch, U. Mons, B. Holleczeck, G. Goliassch, A. Niessner, B. O. Boehm, R. B. Schnabel, H. Brenner, S. Blankenberg, U. Landmesser, and W. Marz. 2013. High-density lipoprotein cholesterol, coronary artery disease, and cardiovascular mortality. *Eur Heart J* **34**: 3563-3571.
4. Wright, R. S. 2013. Recent clinical trials evaluating benefit of drug therapy for modification of HDL cholesterol. *Curr Opin Cardiol* **28**: 389-398.
5. Voight, B. F., G. M. Peloso, M. Orho-Melander, R. Frikke-Schmidt, M. Barbalic, M. K. Jensen, G. Hindy, H. Holm, E. L. Ding, T. Johnson, H. Schunkert, N. J. Samani, R. Clarke, J. C. Hopewell, J. F. Thompson, M. Li, G. Thorleifsson, C. Newton-Cheh, K. Musunuru, J. P. Pirruccello, D. Saleheen, L. Chen, A. Stewart, A. Schillert, U. Thorsteinsdottir, G. Thorgeirsson, S. Anand, J. C. Engert, T. Morgan, J. Spertus, M. Stoll, K. Berger, N. Martinelli, D. Girelli, P. P. McKeown, C. C. Patterson, S. E. Epstein, J. Devaney, M. S. Burnett, V. Mooser, S. Ripatti, I. Surakka, M. S. Nieminen, J. Sinisalo, M. L. Lokki, M. Perola, A. Havulinna, U. de Faire, B. Gigante, E. Ingelsson, T. Zeller, P. Wild, P. I. de Bakker, O. H. Klungel, A. H. Maitland-van der Zee, B. J. Peters, A. de Boer, D. E. Grobbee, P. W. Kamphuisen, V. H. Deneer, C. C. Elbers, N. C. Onland-Moret, M. H. Hofker, C. Wijmenga, W. M. Verschuren, J. M. Boer, Y. T. van der Schouw, A. Rasheed, P. Frossard, S. Demissie, C. Willer, R. Do, J. M. Ordovas, G. R. Abecasis, M. Boehnke, K. L. Mohlke, M. J. Daly, C. Guiducci, N. P. Burt, A. Surti, E. Gonzalez, S. Purcell, S. Gabriel, J. Marrugat, J. Peden, J. Erdmann, P. Diemert, C. Willenborg, I. R. Konig, M. Fischer, C. Hengstenberg, A. Ziegler, I. Buysschaert, D. Lambrechts, F. Van de Werf, K. A. Fox, N. E. El Mokhtari, D. Rubin, J. Schrezenmeir, S. Schreiber, A. Schafer, J. Danesh, S. Blankenberg, R. Roberts, R. McPherson, H. Watkins, A. S. Hall, K. Overvad, E. Rimm, E. Boerwinkle, A. Tybjaerg-Hansen, L. A. Cupples, M. P. Reilly, O. Melander, P. M. Mannucci, D. Ardisino, D. Siscovick, R. Elosua, K. Stefansson, C. J. O'Donnell, V. Salomaa, D. J. Rader, L. Peltonen, S. M. Schwartz, D. Altshuler, and S. Kathiresan. 2012. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* **380**: 572-580.
6. Khera, A. V., M. Cuchel, M. de la Llera-Moya, A. Rodrigues, M. F. Burke, K. Jafri, B. C. French, J. A. Phillips, M. L. Mucksavage, R. L. Wilensky, E. R. Mohler, G. H.

- Rothblat, and D. J. Rader. 2011. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med* **364**: 127-135.
7. Alberti, G., P. Zimmet, J. Shaw, and S. M. Grundy. 2006. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. *Brussels: International Diabetes Federation*: 1-23.
8. Caumo, A., G. Perseghin, A. Brunani, and L. Luzi. 2006. New insights on the simultaneous assessment of insulin sensitivity and beta-cell function with the HOMA2 method. *Diabetes Care* **29**: 2733-2734.
9. Simons, P. C., A. Algra, M. L. Bots, D. E. Grobbee, and Y. van der Graaf. 1999. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). *Circulation* **100**: 951-957.
10. Havel, R. J., H. A. Eder, and J. H. Bragdon. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **34**: 1345-1353.
11. Chapman, M. J., S. Goldstein, D. Lagrange, and P. M. Laplaud. 1981. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* **22**: 339-358.
12. Lima, E. S., and R. C. Maranhao. 2004. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin Chem* **50**: 1086-1088.
13. Lagrost, L. 1998. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol* **110**: 231-241.
14. Jauhiainen, M., and C. Ehnholm. 2005. Determination of human plasma phospholipid transfer protein mass and activity. *Methods* **36**: 97-101.
15. Ehnholm, C., and T. Kuusi. 1986. Preparation, characterization, and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol* **129**: 716-738.
16. Chisholm, J. W., A. K. Gebre, and J. S. Parks. 1999. Characterization of C-terminal histidine-tagged human recombinant lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* **40**: 1512-1519.
17. Navab, M., S. Y. Hama, G. P. Hough, G. Subbanagounder, S. T. Reddy, and A. M. Fogelman. 2001. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res* **42**: 1308-1317.
18. Besler, C., K. Heinrich, L. Rohrer, C. Doerries, M. Riwanto, D. M. Shih, A. Chroni, K. Yonekawa, S. Stein, N. Schaefer, M. Mueller, A. Akhmedov, G. Daniil, C. Manes, C. Templin, C. Wyss, W. Maier, F. C. Tanner, C. M. Matter, R. Corti, C. Furlong, A. J. Lusis, A. von Eckardstein, A. M. Fogelman, T. F. Luscher, and U. Landmesser. 2011. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest* **121**: 2693-2708.
19. Machado-Lima, A., R. T. Iborra, R. S. Pinto, C. H. Sartori, E. R. Oliveira, E. R. Nakandakare, J. T. Stefano, D. Giannella-Neto, M. L. Correa-Giannella, and M. Passarelli. 2013. Advanced glycated albumin isolated from poorly controlled type 1 diabetes mellitus patients alters macrophage gene expression impairing ABCA-1-mediated reverse cholesterol transport. *Diabetes Metab Res Rev* **29**: 66-76.

20. Valiyaveetil, M., N. Kar, M. Z. Ashraf, T. V. Byzova, M. Febbraio, and E. A. Podrez. 2008. Oxidized high-density lipoprotein inhibits platelet activation and aggregation via scavenger receptor BI. *Blood* **111**: 1962-1971.
21. Lamarche, B., S. Rashid, and G. F. Lewis. 1999. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. *Clin Chim Acta* **286**: 145-161.
22. Dullaart, R. P., F. Perton, W. J. Sluiter, R. de Vries, and A. van Tol. 2008. Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity is elevated in metabolic syndrome and is an independent marker of increased carotid artery intima media thickness. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 4860-4866.
23. Li, X. M., W. H. Tang, M. K. Mosior, Y. Huang, Y. Wu, W. Matter, V. Gao, D. Schmitt, J. A. Didonato, E. A. Fisher, J. D. Smith, and S. L. Hazen. 2013. Paradoxical association of enhanced cholesterol efflux with increased incident cardiovascular risks. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**: 1696-1705.
24. Khera, A. V., and D. J. Rader. 2013. Cholesterol efflux capacity: full steam ahead or a bump in the road? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**: 1449-1451.
25. Kaptoge, S., E. Di Angelantonio, L. Pennells, A. M. Wood, I. R. White, P. Gao, M. Walker, A. Thompson, N. Sarwar, M. Caslake, A. S. Butterworth, P. Amouyel, G. Assmann, S. J. L. Bakker, E. L. M. Barr, E. Barrett-Connor, E. J. Benjamin, C. Bjorkelund, H. Brenner, E. Brunner, R. Clarke, J. A. Cooper, P. Cremer, M. Cushman, G. R. Dagenais, R. B. D'Agostino, R. Dankner, G. Davey-Smith, D. Deeg, J. M. Dekker, G. Engstrom, A. R. Folsom, F. G. R. Fowkes, J. Gallacher, J. M. Gaziano, S. Giampaoli, R. F. Gillum, A. Hofman, B. V. Howard, E. Ingelsson, H. Iso, T. Jorgensen, S. Kiechl, A. Kitamura, Y. Kiyohara, W. Koenig, D. Kromhout, L. H. Kuller, D. A. Lawlor, T. W. Meade, A. Nissinen, B. G. Nordestgaard, A. Onat, D. B. Panagiotakos, B. M. Psaty, B. Rodriguez, A. Rosengren, V. Salomaa, J. Kauhanen, J. T. Salonen, J. A. Shaffer, S. Shea, I. Ford, C. D. A. Stehouwer, T. E. Strandberg, R. W. Tipping, A. Toso, S. Wassertheil-Smoller, P. Wennberg, R. G. Westendorp, P. H. Whincup, L. Wilhelmsen, M. Woodward, G. D. O. Lowe, N. J. Wareham, K. T. Khaw, N. Sattar, C. J. Packard, V. Gudnason, P. M. Ridker, M. B. Pepys, S. G. Thompson, J. Danesh, and E. R. Factors. 2012. C-Reactive Protein, Fibrinogen, and Cardiovascular Disease Prediction. *New Engl J Med* **367**: 1310-1320.
26. Martinez, L. R. C., M. H. Miname, L. A. Bortolotto, A. P. M. Chacra, C. E. Rochitte, A. C. Sposito, and R. D. Santos. 2008. No correlation and low agreement of imaging and inflammatory atherosclerosis' markers in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **200**: 83-88.
27. Fournier, N., J. L. Paul, V. Atger, A. Cogny, T. Soni, M. de la Llera-Moya, G. Rothblat, and N. Moatti. 1997. HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2685-2691.
28. Yancey, P. G., M. de la Llera-Moya, S. Swarnakar, P. Monzo, S. M. Klein, M. A. Connelly, W. J. Johnson, D. L. Williams, and G. H. Rothblat. 2000. High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem* **275**: 36596-36604.

29. Tchoua, U., B. K. Gillard, and H. J. Pownall. 2010. HDL superphospholipidation enhances key steps in reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* **209**: 430-435.
30. Andersen, C. J., C. N. Blesso, J. Lee, J. Barona, D. Shah, M. J. Thomas, and M. L. Fernandez. 2013. Egg consumption modulates HDL lipid composition and increases the cholesterol-accepting capacity of serum in metabolic syndrome. *Lipids* **48**: 557-567.
31. de Vries, R., S. E. Borggreve, and R. P. Dullaart. 2003. Role of lipases, lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in abnormal high density lipoprotein metabolism in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab* **49**: 601-613.
32. Kontush, A., E. C. de Faria, S. Chantepie, and M. J. Chapman. 2004. Antioxidative activity of HDL particle subspecies is impaired in hyperalphalipoproteinemia: relevance of enzymatic and physicochemical properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 526-533.
33. Kontush, A., S. Chantepie, and M. J. Chapman. 2003. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**: 1881-1888.
34. Kontush, A., and M. J. Chapman. 2010. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol* **21**: 312-318.
35. Calzada, C., E. Vericel, R. Colas, N. Guillot, G. El Khoury, J. Draï, A. Sassolas, N. Peretti, G. Ponsin, M. Lagarde, and P. Moulin. 2013. Inhibitory effects of in vivo oxidized high-density lipoproteins on platelet aggregation: evidence from patients with abetalipoproteinemia. *FASEB J* **27**: 2855-2861.
36. de Beer, M. C., D. M. Durbin, L. Cai, A. Jonas, F. C. de Beer, and D. R. van der Westhuyzen. 2001. Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. *J Lipid Res* **42**: 309-313.
37. McGrath, K. C., X. H. Li, P. T. Whitworth, R. Kasz, J. T. Tan, S. V. McLennan, D. S. Celermajer, P. J. Barter, K. A. Rye, and A. K. Heather. 2014. High density lipoproteins improve insulin sensitivity in high-fat diet-fed mice by suppressing hepatic inflammation. *J Lipid Res* **55**: 421-430.
38. Carvalho, L. S., N. V. Martins, F. A. Moura, R. M. Cintra, O. L. Almeida, J. C. Quinaglia e Silva, and A. C. Sposito. 2013. High-density lipoprotein levels are strongly associated with the recovery rate of insulin sensitivity during the acute phase of myocardial infarction: a study by euglycemic hyperinsulinemic clamp. *J Clin Lipidol* **7**: 24-28.

## Figure Legends

Figure 1. Flow diagram representing study participants selection. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; TSH, thyroid stimulating hormone; FT, free thyroxin; HDL-C, HDL-cholesterol.

## Tables

TABLE 1. Baseline characteristics

	LH	IH	HH	P
Sample size	33	33	35	
Male, %	49	36	37	$\leq 0.001^{a,b}$
Age, years	41 $\pm$ 14	41 $\pm$ 14	46 $\pm$ 14	0.216
BMI, kg/m <sup>2</sup>	25 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3	$\leq 0.001^{a,b}$
Waist, cm	83 $\pm$ 10	73 $\pm$ 10	69 $\pm$ 7	$\leq 0.001^{a,b}$
SBP, mmHg	116 (10)	120 (20)	120 (12)	0.281
DBP, mmHg	79 (10)	80 (10)	80 (13)	0.330
IMT, mm	0.72 $\pm$ 0.31	0.61 $\pm$ 0.20	0.65 $\pm$ 0.15	$\leq 0.001$
HDL-C, mg/dL	31 (5)	50 (11)	90 (11)	$\leq 0.001^{a,b,c}$
TG, mg/dL	109 (59)	68 (25)	57 (23)	$\leq 0.001^{a,b}$
LDL-C, mg/dL	103 $\pm$ 20	95 $\pm$ 18	102 $\pm$ 21	0.234
Glucose, mg/dL	84 $\pm$ 8	83 $\pm$ 8	82 $\pm$ 7	0.522
Insulin, $\mu$ U/mL	6 (6)	4 (3)	3 (3)	$\leq 0.001^{a,b}$
HOMA2S, %	162 (140)	255 (224)	279 (268)	$\leq 0.001^{a,b}$
CRP, mg/dL	1.1 (3.9)	0.9 (2.4)	0.7 (0.6)	0.038 <sup>a</sup>
ApoA-I, mg/dL	100 $\pm$ 16	148 $\pm$ 15	199 $\pm$ 28	$\leq 0.001^{a,b,c}$
ApoB, mg/dL	83 $\pm$ 17	80 $\pm$ 16	78 $\pm$ 16	0.573
Lp(a), mg/dL	10 (15)	20 (26)	15 (22)	0.056

CETP, %	14±5	13±7	12±5	0.660
PLTP, µmolPC/mL/h	6.41±2.05	5.67±1.46	6.75±2.13	0.063
LCAT, µmolCE/mL/h	23±9	15±9	16±8	0.001 <sup>a,b</sup>
LPL, µmolFFA/mL/h	3.18 (1.98)	4.55 (4.00)	4.66 (2.64)	0.222
HL, µmolFFA/mL/h	6.78±4.56	6.00±2.38	4.25±2.76	0.010 <sup>a</sup>

Data shown as mean±SD or median (interquartile range). LH, Low HDL-C group; IH, Intermediate HDL-C group; HH, High HDL-C group; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; IMT, carotid artery intima-media thickness; HDL-C, HDL-cholesterol; LDL-C, LDL-cholesterol; Lp(a), lipoprotein (a); CETP, cholesteryl ester transfer protein; PLTP, phospholipids transfer protein; PC, phosphatidylcholine; CE, cholesteryl ester; HL, hepatic lipase. p values were obtained by ANOVA or Kruskal-Wallis. IMT comparisons were adjusted for age and gender. Significant differences (p<0.05) by Bonferroni test were indicated by: <sup>a</sup>= LH vs. HH, <sup>b</sup>= LH vs. IH, <sup>c</sup>= IH vs. HH.

TABLE 2. HDL characterization

	LH	IH	HH	P
Molar concentration, nmol/mL	3.80±1.03	4.33±1.16	5.51±0.99	≤0.001 <sup>a,c</sup>
<i>Total mass, mg/dL</i>	199±54	227±62	289±52	≤0.001 <sup>a,c</sup>
TG, %	4±2	4±2	3±1	0.001 <sup>a</sup>
Free cholesterol, %	2±1	3±1	3±1	0.031 <sup>a</sup>
Cholesteryl ester, %	15±7	22±7	26±5	≤0.001 <sup>a,b</sup>
Phospholipids, %	12±4	14±5	13±3	0.035 <sup>b</sup>
ApoA-I, %	34±12	34±9	36±8	0.751
Total proteins, %	66±12	56±12	55±7	≤0.001 <sup>a,b</sup>
HDL size, nm	7.33±0.33	7.72±0.45	8.49±0.42	≤0.001 <sup>a,b,c</sup>
Zeta potential, mV	-7.41±3.81	-6.95±4.95	-6.95±4.32	0.886

Data shown as mean±SD. P values were obtained by ANOVA. Significant differences

(p<0.05) by Bonferroni test were indicated by: <sup>a</sup>= LH vs. HH, <sup>b</sup>= LH vs. IH, <sup>c</sup>= IH vs. HH.



TABLE 3. HDL functions and susceptibility to oxidation

	LH	IH	HH	P
Antioxidant activity, %	55 (41)	48 (35)	37 (53)	0.003 <sup>a</sup>
Susceptibility to oxidation, %	46±25	45±20	57±22	0.017 <sup>a,c</sup>
Anti-inflammatory activity, %	12 (41)	14 (42)	23 (37)	0.943
Cholesterol efflux, %	9±3	12±3	11±4	≤0.001 <sup>a,b</sup>
Inhibition of platelet aggregation, %	37±24	31±18	45±25	0.0026 <sup>c</sup>

Data shown as mean±SD or median (interquartile range). P values were obtained by

ANOVA or Kruskal-Wallis. Significant differences (p<0.05) by Bonferroni test were

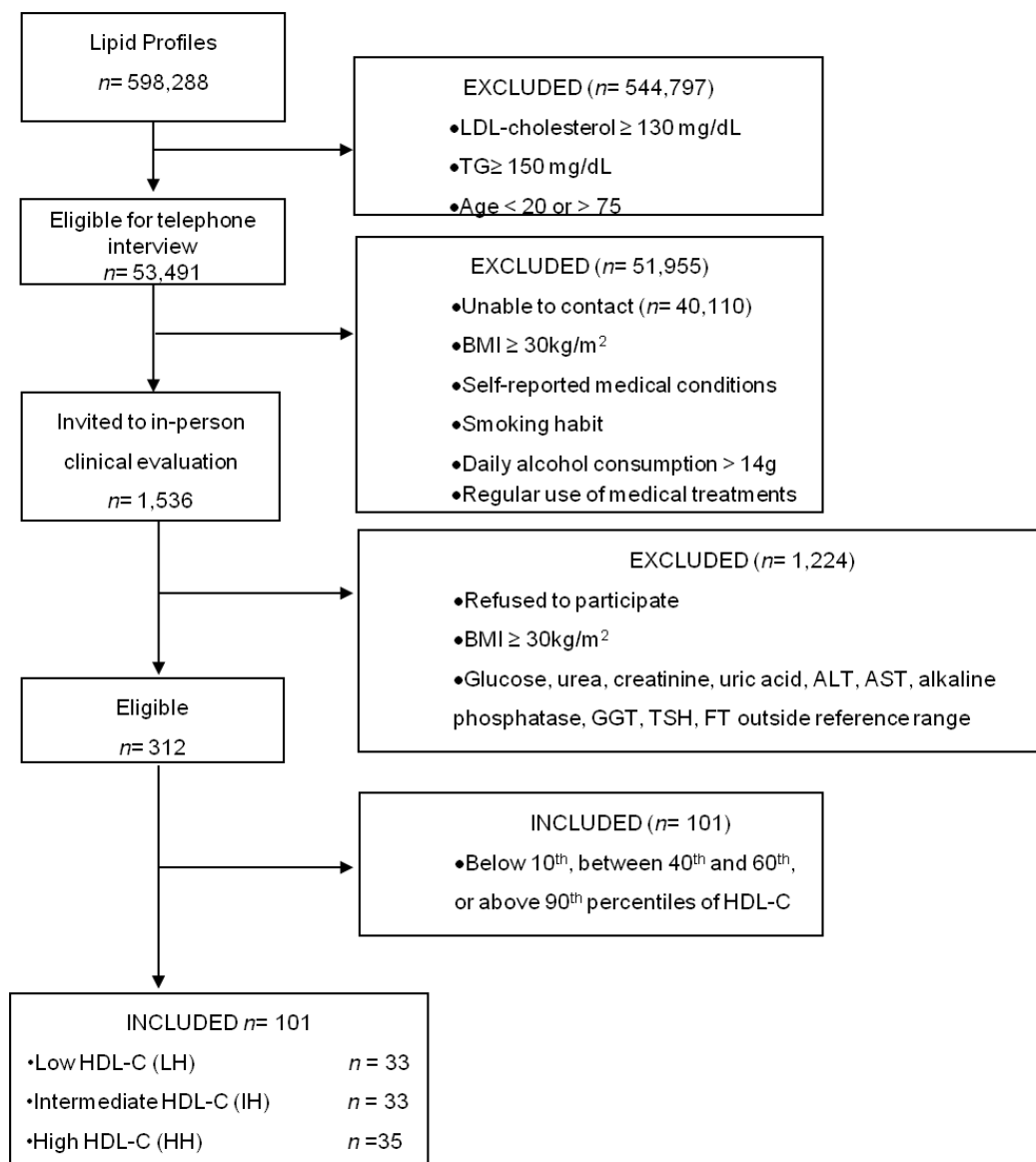
indicated by: <sup>a</sup>= LH vs. HH, <sup>b</sup>= LH vs. IH, <sup>c</sup>= IH vs. HH.

Table 4. HDL characteristics and atherosclerosis

	cIMT < 1mm	cIMT > 1mm	P
Sample size	88	12	
HDL size, nm	7.89±0.64	7.55±0.49	≤0.001
Molar concentration, nmol/mL	4.60±1.30	4.20±1.18	≤0.001
Antioxidant activity, %	49 (42)	37 (23)	0.018
Susceptibility to oxidation, %	50±23	40±23	0.082
Cholesterol efflux <sup>a</sup> , %	40±14	31±14	0.020
Inhibition of platelet aggregation, %	38±24	44±20	0.299

Data shown as mean±SD or median (interquartile range). <sup>a</sup>Cholesterol efflux recalculated as a function of HDL molar concentration. P values were obtained by ANCOVA, adjusted for gender, age and HDL-cholesterol.

Figure 1.





*Conclusão geral*



Indivíduos sem doença cardiovascular pré-existente com hipoalfalipoproteinemia ou aterosclerose carotídea subclínica são caracterizados por partículas menores de HDL, com conteúdo reduzido de fosfolípidos, e menor capacidade de efluxo de colesterol celular. Este fenótipo pode ser uma explicação para o aumento da carga aterosclerótica.





*Referências Bibliográficas*



1. Organização Mundial da Saúde. Cardiovascular Diseases (CVDs). Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>>. Acesso em: 15 de junho de 2010.
2. Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, Giakoumi SM, Kypreos KE. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010 Jan;208(1):3-9.
3. Mansur AdP, Favarato D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: a 2011 update. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2012;99(2):755-61.
4. Baena CP, Chowdhury R, Schio NA, Sabbag AE, Jr., Guarita-Souza LC, Olandoski M, et al. Ischaemic heart disease deaths in Brazil: current trends, regional disparities and future projections. *Heart*. 2013 Sep;99(18):1359-64.
5. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev*. 2006 Sep;58(3):342-74.
6. Konstantinov IE, Mejevoi N, Anichkov NM, Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis. *Tex Heart Inst J*. 2006;33(4):417-23.
7. Barr DP, Russ EM, Eder HA. Protein-lipid relationships in human plasma. II. In atherosclerosis and related conditions. *Am J Med*. 1951 Oct;11(4):480-93.
8. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition: Expert Consult-Online: Elsevier Health Sciences; 2009.
9. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(4 Suplemento 1):1-22.
10. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32.
11. Chang MY, Potter-Perigo S, Wight TN, Chait A. Oxidized LDL bind to nonproteoglycan components of smooth muscle extracellular matrices. *J Lipid Res*. 2001 May;42(5):824-33.
12. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2003 Oct;14(5):421-30.
13. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005 Apr 21;352(16):1685-95.
14. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009 Jun;6(6):399-409.
15. Adiguzel E, Ahmad PJ, Franco C, Bendeck MP. Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. *Vasc Med*. 2009 Feb;14(1):73-89.
16. van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res*. 1999 Feb;41(2):334-44.

17. Gordon DJ, Knoke J, Probstfield JL, Superko R, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in hypercholesterolemic men: the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *Circulation*. 1986 Dec;74(6):1217-25.
18. Miller NE, Thelle DS, Forde OH, Mjos OD. The Tromso heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study. *Lancet*. 1977 May 7;1(8019):965-8.
19. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med*. 1977 May;62(5):707-14.
20. Miller M, Seidler A, Kwiterovich PO, Pearson TA. Long-term predictors of subsequent cardiovascular events with coronary artery disease and 'desirable' levels of plasma total cholesterol. *Circulation*. 1992 Oct;86(4):1165-70.
21. Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*. 2009 Nov 11;302(18):1993-2000.
22. Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2007 Sep 27;357(13):1301-10.
23. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003 Nov 5;290(17):2292-300.
24. Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL, Ibrahim R, Lesperance J, Heinonen TM, et al. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007 Apr 18;297(15):1675-82.
25. Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Fitzgerald A, Conroy R, Sans S, et al. How much does HDL cholesterol add to risk estimation? A report from the SCORE Investigators. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009 Jun;16(3):304-14.
26. Silbernagel G, Schottker B, Appelbaum S, Scharnagl H, Kleber ME, Grammer TB, et al. High-density lipoprotein cholesterol, coronary artery disease, and cardiovascular mortality. *Eur Heart J*. 2013 Dec;34(46):3563-71.
27. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest*. 1990 Apr;85(4):1234-41.
28. Paszty C, Maeda N, Verstuyft J, Rubin EM. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*. 1994 Aug;94(2):899-903.
29. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G, et al. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation*. 1996 Aug 15;94(4):713-7.
30. Nicholls SJ, Cutri B, Worthley SG, Kee P, Rye KA, Bao S, et al. Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Nov;25(11):2416-21.

31. Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med*. 2011 Dec 15;365(24):2255-67.
32. HPS2-THRIVE Collaborative Group. Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events. Disponível em <<http://www.thrivestudy.org/>>. Acesso em: 14 de novembro de 2013.
33. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007 Nov 22;357(21):2109-22.
34. Roche Inc. Roche provides update on Phase III study of dalcetrapib [press release]. Disponível em <[http://http://www.roche.com/media/media\\_releases/med-cor-2012-05-07.htm](http://http://www.roche.com/media/media_releases/med-cor-2012-05-07.htm)>. Acesso em 08 de janeiro de 2014.
35. Nicholls S, Ballantyne C, Barter P, Brewer B, Kastelein J, Gordon A. ASSURE: effect of an oral agent inducing Apo AI synthesis on progression of coronary atherosclerosis: results of the ASSURE study. *European Society of Cardiology Congress 2013; Amsterdam, The Netherlands: Revista espanola de cardiologia*; 2013. p. e6-e7.
36. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*. 2012 Aug 11;380(9841):572-80.
37. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2011 Oct;17(10):594-603.
38. Kontush A. *High-density lipoproteins: structure, metabolism, function and therapeutics* John Wiley & Sons. Inc, Hoboken, New Jersey. 2011.
39. Eren E, Yilmaz N, Aydin O. Functionally defective high-density lipoprotein and paraoxonase: a couple for endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Cholesterol*. 2013;2013:10.
40. Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jun;29(6):870-6.
41. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):746-56.
42. Forti N, Diament J. High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. An update for clinicians. *Arq Bras Cardiol*. 2006 Nov;87(5):671-9.
43. Massey JB, Pownall HJ, Macha S, Morris J, Tubb MR, Silva RA. Mass spectrometric determination of apolipoprotein molecular stoichiometry in reconstituted high density lipoprotein particles. *J Lipid Res*. 2009 Jun;50(6):1229-36.
44. Gordon JI, Budelier KA, Sims HF, Edelstein C, Scanu AM, Strauss AW. Biosynthesis of human preproapolipoprotein A-II. *J Biol Chem*. 1983 Nov 25;258(22):14054-9.

45. Jonas A. Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Jul 30;1084(3):205-20.
46. Rosenson RS, Stafforini DM. Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2. *J Lipid Res*. 2012 Sep;53(9):1767-82.
47. Aviram M, Vaya J. Paraoxonase 1 activities, regulation, and interactions with atherosclerotic lesion. *Curr Opin Lipidol*. 2013 Aug;24(4):339-44.
48. Albers JJ, Vuletic S, Cheung MC. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1821(3):345-57.
49. Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb 1;23(2):160-7.
50. Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res*. 2009 Mar;50(3):574-85.
51. Yetukuri L, Soderlund S, Koivuniemi A, Seppanen-Laakso T, Niemela PS, Hyvonen M, et al. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol. *J Lipid Res*. 2010 Aug;51(8):2341-51.
52. Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res*. 2013 Nov;54(11):2950-63.
53. Nilsson A, Duan RD. Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *J Lipid Res*. 2006 Jan;47(1):154-71.
54. Saito H, Arimoto I, Tanaka M, Sasaki T, Tanimoto T, Okada S, et al. Inhibition of lipoprotein lipase activity by sphingomyelin: role of membrane surface structure. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul 19;1486(2-3):312-20.
55. Rye KA, Hime NJ, Barter PJ. The influence of sphingomyelin on the structure and function of reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1996 Feb 23;271(8):4243-50.
56. Davidson WS, Sparks DL, Lund-Katz S, Phillips MC. The molecular basis for the difference in charge between pre-beta- and alpha-migrating high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1994 Mar 25;269(12):8959-65.
57. Davidson WS, Thompson TB. The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 2007 Aug 3;282(31):22249-53.
58. Rosenson RS, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem*. 2011 Mar;57(3):392-410.
59. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res*. 1981 Feb;22(2):339-58.
60. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*. 1981 Sep 24;665(3):408-19.

61. Sparks DL, Phillips MC. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res.* 1992 Jan;33(1):123-30.
62. Abdi S, Dorranean D, Razavi AE, Naderi GA, Boshtam M, Ghorannevis M. Evaluation of the effects of weak and moderate static magnetic fields on the characteristics of human low density lipoprotein in vitro. *Bioelectromagnetics.* 2013 Jul;34(5):397-404.
63. Masson D, Athias A, Lagrost L. Evidence for electronegativity of plasma high density lipoprotein-3 as one major determinant of human cholesteryl ester transfer protein activity. *J Lipid Res.* 1996 Jul;37(7):1579-90.
64. Desrumaux C, Athias A, Masson D, Gambert P, Lallemant C, Lagrost L. Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipid transfer protein. *J Lipid Res.* 1998 Jan;39(1):131-42.
65. Rye KA, Barter PJ. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Mar;24(3):421-8.
66. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Jan;21(1):13-27.
67. Atmeh RF, Abd Elrazeq IO. Small high density lipoprotein subclasses: some of their physico-chemical properties and stability in solution. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):515-25.
68. Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol.* 2010 Jun;21(3):229-38.
69. Chapman MJ, Le Goff W, Guerin M, Kontush A. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Eur Heart J.* 2010 Jan;31(2):149-64.
70. Curtiss LK, Valenta DT, Hime NJ, Rye KA. What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jan;26(1):12-9.
71. Escola-Gil JC, Rotllan N, Julve J, Blanco-Vaca F. In vivo macrophage-specific RCT and antioxidant and antiinflammatory HDL activity measurements: New tools for predicting HDL atheroprotection. *Atherosclerosis.* 2009 Oct;206(2):321-7.
72. Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, Phillips MC, et al. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res.* 2007 Nov;48(11):2453-62.
73. Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med.* 2008 Mar;263(3):256-73.
74. Nagao K, Zhao Y, Takahashi K, Kimura Y, Ueda K. Sodium taurocholate-dependent lipid efflux by ABCA1: effects of W590S mutation on lipid translocation and apolipoprotein A-I dissociation. *J Lipid Res.* 2009 Jun;50(6):1165-72.
75. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* 1999 Aug;22(4):336-45.

76. Catalano G, Duchene E, Julia Z, Le Goff W, Bruckert E, Chapman MJ, et al. Cellular SR-BI and ABCA1-mediated cholesterol efflux are gender-specific in healthy subjects. *J Lipid Res.* 2008 Mar;49(3):635-43.
77. Chroni A, Liu T, Fitzgerald ML, Freeman MW, Zannis VI. Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. *Biochemistry.* 2004 Feb 24;43(7):2126-39.
78. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):28240-5.
79. Klucken J, Buchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G, et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 18;97(2):817-22.
80. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 29;101(26):9774-9.
81. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005 Feb;1(2):121-31.
82. Nakamura K, Kennedy MA, Baldan A, Bojanic DD, Lyons K, Edwards PA. Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):45980-9.
83. Small DM. Role of ABC transporters in secretion of cholesterol from liver into bile. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):4-6.
84. Tabas I, Tall AR. Mechanism of the association of HDL3 with endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. Evidence against the role of specific ligand and receptor proteins. *J Biol Chem.* 1984 Nov 25;259(22):13897-905.
85. Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab.* 2008 May;7(5):365-75.
86. Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, Tall AR. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jun;26(6):1310-6.
87. de la Llera-Moya M, Rothblat GH, Connelly MA, Kellner-Weibel G, Sakr SW, Phillips MC, et al. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J Lipid Res.* 1999 Mar;40(3):575-80.
88. Yancey PG, Asztalos BF, Stettler N, Piccoli D, Williams DL, Connelly MA, et al. SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol efflux to serum from patients with Alagille syndrome. *J Lipid Res.* 2004 Sep;45(9):1724-32.
89. Tricerri A, Corsico B, Toledo JD, Garda HA, Brenner RR. Conformation of apolipoprotein AI in reconstituted lipoprotein particles and particle-membrane interaction: effect of cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Mar 6;1391(1):67-78.



90. Rotllan N, Ribas V, Calpe-Berdiel L, Martin-Campos JM, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. Overexpression of human apolipoprotein A-II in transgenic mice does not impair macrophage-specific reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Sep;25(9):e128-32.
91. Westerterp M, Van Eck M, de Haan W, Offerman EH, Van Berkel TJ, Havekes LM, et al. Apolipoprotein CI aggravates atherosclerosis development in ApoE-knockout mice despite mediating cholesterol efflux from macrophages. *Atherosclerosis.* 2007 Nov;195(1):e9-16.
92. Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. *Nat Med.* 2005 Apr;11(4):418-22.
93. Scharnagl H, Heuschneider C, Sailer S, Kleber ME, Marz W, Ritsch A. Decreased Cholesterol Efflux Capacity in Patients with Low CETP Plasma Levels. *Eur J Clin Invest.* 2014 Jan 28.
94. Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, et al. High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem.* 2000 Nov 24;275(47):36596-604.
95. Davidson WS, Gillotte KL, Lund-Katz S, Johnson WJ, Rothblat GH, Phillips MC. The effect of high density lipoprotein phospholipid acyl chain composition on the efflux of cellular free cholesterol. *J Biol Chem.* 1995 Mar 17;270(11):5882-90.
96. Favari E, Calabresi L, Adorni MP, Jessup W, Simonelli S, Franceschini G, et al. Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry.* 2009 Nov 24;48(46):11067-74.
97. Ishigaki Y, Katagiri H, Gao J, Yamada T, Imai J, Uno K, et al. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation.* 2008 Jul 1;118(1):75-83.
98. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res.* 2004 Jun;45(6):993-1007.
99. Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, Fogelman AM, Lusis AJ. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med.* 2001 Apr-May;11(3-4):155-61.
100. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol.* 2010 Aug;21(4):312-8.
101. Zerrad-Saadi A, Therond P, Chantepie S, Couturier M, Rye KA, Chapman MJ, et al. HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Dec;29(12):2169-75.

102. Christison JK, Rye KA, Stocker R. Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1995 Sep;36(9):2017-26.
103. Girotti AW. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. *Free Radic Biol Med.* 2008 Mar 15;44(6):956-68.
104. Garner B, Waldeck AR, Witting PK, Rye KA, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem.* 1998 Mar 13;273(11):6088-95.
105. Suc I, Escargueil-Blanc I, Troly M, Salvayre R, Negre-Salvayre A. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Oct;17(10):2158-66.
106. Sugano M, Tsuchida K, Makino N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jun 16;272(3):872-6.
107. Robbesyn F, Garcia V, Auge N, Vieira O, Frisach MF, Salvayre R, et al. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J.* 2003 Apr;17(6):743-5.
108. Yvan-Charvet L, Pagler TA, Seimon TA, Thorp E, Welch CL, Witztum JL, et al. ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis. *Circ Res.* 2010 Jun 25;106(12):1861-9.
109. Tabet F, Lambert G, Cuesta Torres LF, Hou L, Sotirchos I, Touyz RM, et al. Lipid-free apolipoprotein A-I and discoidal reconstituted high-density lipoproteins differentially inhibit glucose-induced oxidative stress in human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 May;31(5):1192-200.
110. Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, Bao S, Drummond GR, Rye KA, et al. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation.* 2005 Mar 29;111(12):1543-50.
111. Panzenbock U, Stocker R. Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms of oxidized high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jan 17;1703(2):171-81.
112. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000 Sep;41(9):1495-508.
113. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006 Mar;3(3):144-53.
114. Goyal J, Wang K, Liu M, Subbaiah PV. Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *J Biol Chem.* 1997 Jun 27;272(26):16231-9.
115. Teiber JF, Draganov DI, La Du BN. Purified human serum PON1 does not protect LDL against oxidation in the in vitro assays initiated with copper or AAPH. *J Lipid Res.* 2004 Dec;45(12):2260-8.

116. Kriska T, Marathe GK, Schmidt JC, McIntyre TM, Girotti AW. Phospholipase action of platelet-activating factor acetylhydrolase, but not paraoxonase-1, on long fatty acyl chain phospholipid hydroperoxides. *J Biol Chem.* 2007 Jan 5;282(1):100-8.
117. Garner B, Witting PK, Waldeck AR, Christison JK, Raftery M, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *J Biol Chem.* 1998 Mar 13;273(11):6080-7.
118. Goulinet S, Chapman MJ. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Apr;17(4):786-96.
119. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Oct 1;23(10):1881-8.
120. Shuhei N, Soderlund S, Jauhiainen M, Taskinen MR. Effect of HDL composition and particle size on the resistance of HDL to the oxidation. *Lipids Health Dis.* 2010;9:104.
121. Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Negre-Salvayre A, de Souza JA, et al. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Aug;27(8):1843-9.
122. Shaw JA, Bobik A, Murphy A, Kanellakis P, Blombery P, Mukhamedova N, et al. Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque. *Circ Res.* 2008 Nov 7;103(10):1084-91.
123. van Leuven SI, Birjmohun RS, Franssen R, Bisoendial RJ, de Kort H, Levels JH, et al. ApoAI-phosphatidylcholine infusion neutralizes the atherothrombotic effects of C-reactive protein in humans. *J Thromb Haemost.* 2009 Feb;7(2):347-54.
124. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Nov;15(11):1987-94.
125. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, De Palma A, Saresella M, Ferrante P, et al. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Sep 8;238(1):61-5.
126. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Ability of reconstituted high density lipoproteins to inhibit cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *J Lipid Res.* 1999 Feb;40(2):345-53.
127. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995 Dec;96(6):2758-67.
128. McGrath KC, Li XH, Puranik R, Liong EC, Tan JT, Dy VM, et al. Role of 3beta-hydroxysteroid-delta 24 reductase in mediating antiinflammatory effects of high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Jun;29(6):877-82.

129. Kimura T, Tomura H, Sato K, Ito M, Matsuoka I, Im DS, et al. Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2010 Feb 12;285(7):4387-97.
130. Furnkranz A, Schober A, Bochkov VN, Bashtrykov P, Kronke G, Kadl A, et al. Oxidized phospholipids trigger atherogenic inflammation in murine arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Mar;25(3):633-8.
131. Theilmeier G, De Geest B, Van Veldhoven PP, Stengel D, Michiels C, Lox M, et al. HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE<sup>-/-</sup> mice. *FASEB J*. 2000 Oct;14(13):2032-9.
132. Wang L, Chen WZ, Wu MP. Apolipoprotein A-I inhibits chemotaxis, adhesion, activation of THP-1 cells and improves the plasma HDL inflammatory index. *Cytokine*. 2010 Feb;49(2):194-200.
133. Recalde D, Ostos MA, Badell E, Garcia-Otin AL, Pidoux J, Castro G, et al. Human apolipoprotein A-IV reduces secretion of proinflammatory cytokines and atherosclerotic effects of a chronic infection mimicked by lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Apr;24(4):756-61.
134. Nofer JR, Assmann G. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated lysosphingolipids. *Trends Cardiovasc Med*. 2005 Oct;15(7):265-71.
135. Rye KA, Barter PJ. Antiinflammatory actions of HDL: a new insight. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Nov;28(11):1890-1.
136. Yu BL, Wang SH, Peng DQ, Zhao SP. HDL and immunomodulation: an emerging role of HDL against atherosclerosis. *Immunol Cell Biol*. 2010 Mar-Apr;88(3):285-90.
137. Rosenblat M, Aviram M. Paraoxonases role in the prevention of cardiovascular diseases. *Biofactors*. 2009 Jan-Feb;35(1):98-104.
138. Dullaart RP, Perton F, Kappelle PJ, de Vries R, Sluiter WJ, van Tol A. Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity modifies the inverse relationship of C-reactive protein with HDL cholesterol in nondiabetic men. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1801(1):84-8.
139. Tolle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge UJ, Lorkowski S, et al. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Aug;28(8):1542-8.
140. Xia P, Vadas MA, Rye KA, Barter PJ, Gamble JR. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem*. 1999 Nov 12;274(46):33143-7.
141. Keul P, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Bode C, Graler M, Heusch G, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circ Res*. 2011 Feb 4;108(3):314-23.
142. Ashby DT, Rye KA, Clay MA, Vadas MA, Gamble JR, Barter PJ. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Sep;18(9):1450-5.
143. Nofer JR, Brodde MF, Kehrel BE. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010 Jul;37(7):726-35.

144. Calkin AC, Drew BG, Ono A, Duffy SJ, Gordon MV, Schoenwaelder SM, et al. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation*. 2009 Nov 24;120(21):2095-104.
145. Nofer JR, Walter M, Kehrel B, Wierwille S, Tepel M, Seedorf U, et al. HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-tris-phosphate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Jun;18(6):861-9.
146. Fujimoto Y, Tsunomori M, Muta E, Yamamoto T, Nishida H, Sakuma S, et al. High density lipoprotein inhibits platelet 12-lipoxygenase activity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1994 Sep;85(3):355-8.
147. Chen LY, Mehta JL. Inhibitory effect of high-density lipoprotein on platelet function is mediated by increase in nitric oxide synthase activity in platelets. *Life Sci*. 1994;55(23):1815-21.
148. Valiyaveetil M, Kar N, Ashraf MZ, Byzova TV, Febbraio M, Podrez EA. Oxidized high-density lipoprotein inhibits platelet activation and aggregation via scavenger receptor BI. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):1962-71.
149. Brodde MF, Korporaal SJ, Herminghaus G, Fobker M, Van Berkel TJ, Tietge UJ, et al. Native high-density lipoproteins inhibit platelet activation via scavenger receptor BI: role of negatively charged phospholipids. *Atherosclerosis*. 2011 Apr;215(2):374-82.
150. Imachi H, Murao K, Cao W, Tada S, Taminato T, Wong NC, et al. Expression of human scavenger receptor B1 on and in human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 May 1;23(5):898-904.
151. Desai K, Bruckdorfer KR, Hutton RA, Owen JS. Binding of apoE-rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. *J Lipid Res*. 1989 Jun;30(6):831-40.
152. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011 Jan 13;364(2):127-35.



*Anexo*





# APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 17/01/11  
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1260/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).  
CAAE: 0989.0.146.000-10

## I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "FUNÇÕES ATEROPROTETORAS DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL), ALÉM DE SEUS NÍVEIS DE COLESTEROL, EM INDIVÍDUOS NORMOLIPÊMICOS E EM SITUAÇÕES DE AUMENTO E REDUÇÃO DE HDL: ESTUDO EM AMOSTRA POPULACIONAL BRASILEIRA".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Natália Baratella Panzoldo

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/12/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 17/01/12 (O formulário encontra-se no site acima).

## II - OBJETIVOS

Determinar a funcionalidade da fração HDL de indivíduos normoalfalipoproteinêmicos, hiperalfalipoproteinêmicos e hipoalfalipoproteinêmicos, através de suas propriedades anti-oxidantes, antiinflamatórias e anti-apoptóticas.

## III - SUMÁRIO

Evidências experimentais mostram que a concentração plasmática da fração HDL nem sempre é o único determinante de sua capacidade ateroprotetora, sendo que os efeitos pleiotrópicos desta fração, como ações antiinflamatórias, anti-apoptóticas e anti-oxidantes independem da sua concentração plasmática. Serão incluídos de 50 a 100 pacientes de ambos os sexos com idades entre 20-78 anos e índice de massa corpórea  $<25 \text{ cm/m}^2$ . Será coletado o sangue venoso periférico para determinação da expressão dos receptores celulares que transportam o colesterol, componentes bioquímicos na regulação da produção celular de colesterol e marcadores no plasma da síntese corpórea de colesterol. Serão excluídos pacientes que fazem uso de medicamentos que interferem no metabolismo do colesterol, como estatinas, fibratos, ácido nicotínico, quelantes de sais biliares, ezetimibe, agonistas PPAR, anticoncepcional, terapia de reposição hormonal, que apresentam patologias (dislipidemias primárias e secundárias), hábito de fumar e padrão abusivo de ingestão de álcool.

## IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Informamos que esse projeto não necessitaria entrar como protocolo novo e poderia ter sido apresentado como adendo ao protocolo 120/2007, simplificando o trânsito por este Comitê de Ética em Pesquisa e podendo ter despacho em menor prazo.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

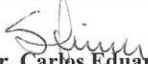
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de dezembro de 2010.

  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP